Kinetik von VIII C und VIII AG bei Normalpersonen, Konduktorinnen und Hämophilie A:

von
Heinrich Untiedt

1982

Diss. Düsseldorf

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0069

Aus der Universitäts Kinderklinik B
Direktor: Prof. Dr. med. E. Schmidt

KINETIK VON VIII C UND VIII AG BEI NORMALPERSONEN, KONDUKTORINNEN UND HÄMOPHILIE A:

D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER MEDIZIN
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Heinrich Untiedt
1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düssldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Arnold

Referent
gez. Prof. Dr. Göbel

Korreferent
gez. Priv. Doz. Dr. Reimers

Doris und meinen Eltern

Seite

1. Einleitung

1.1. Hämophilie A 1

1.2. Rolle des Faktor VIII im Gerinnungssystem 1

1.2.1. Diagnostik von Faktor VIII Mangelzuständen 2

1.2.2. Therapie bei Faktor VIII Mangelzuständen 3

1.2.3. Physiko- chemische Eigenschaften 3

1.2.4. Synthese und Speicherung des Molekülkomplexes 4

1.3. Faktor VIII:c und VIII AG bei Normalpersonen 5

1.3.1. Schwankungen von VIII:c und VIII AG unter Berücksichtigung physiologischer und pathologischer Zustände bei Normalpersonen 5

1.4. Faktor VIII bei Patienten mit Hämophilie A 6

1.5. Faktor VIII bei Konduktorinnen 7

1.6. Weitere Gerinnungsparameter 8

1.7. Das Pharmakon DDAVP und seine klinische Anwendung 8

1.7.1. DDAVP induzierte Veränderungen der Gerinnungsparameter 9

1.7.2. Dosierung und Anwendung von DDAVP bei Blutern 10

1.8 Zielsetzung 10

2. Untersuchungsaufbau 12

3. Material und Methoden 14

3.1. Gewinnung von Normal- und Patientenplasma 14

3.2. Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität 14

3.2.1. Durchführung der Tests 15

3.3. Bestimmung des Faktor VIII assoziierten Antigens 16

3.3.1. Elektrophoresekammer 18

Seite

3.3.2. Auswertung der Platten und Berechnung der Konzentration des Faktor VIII assoz. AG. 20

3.4. Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit 21

3.4.1. Durchführung des Tests 21

3.5 Bestimmung des Fibrinogengehaltes im Plasma 22

3.5.1. Durchführung des Testes. 22

4. Ergebnisse. 24

4.1. Erstellung einer Eichkurve zur Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität. 24

4.1.1. Herstellung einer Eichkurve für die Bestimmung der Faktor VIII ass. Antigenkonzentration. 25

4.1.2. Erstellung der Eichkurve für die Bestimmung des Fibrinogen. 28

4.2. Untersuchung der gesunden Normalpersonen. 30

4.2.1. Untersuchung der gesunden Normalpersonen im Doppelblindversuch 34

4.2.2. Untersuchung der gesunden Normalpersonen bei nasaler Applikation von DDAVP. 38

4.3. Untersuchung der Patienten mit Hämophilie A. 40

4.4. Untersuchung der Gerinnungsparamter Faktor VIII:c, VIII:AG, PTT und Fibrinogen unter DDAVP Belastung bei sicheren, wahrscheinlichen und möglichen Konduktorinnen für Hämophilie A. 43

4.5. Untersuchung des methodischen Fehlers für die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität des Faktor VIII assoziierten Antigens, der PTT und des Fibrinogens. 54

4.5.1. Untersuchung des systematischen Fehlers für die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität des Faktor VIII assoz. Antigens, der PTT und des Fibrinogens. 57

		Seite
5.	Diskussion	59
5.1.	DDAVP i. v. bei Normalpersonen.	59
5.1.1.	Doppelblindversuch mit DDAVP bei Normalpersonen.	62
5.1.2.	DDAVP nasal appliziert bei Normalpersonen.	68
5.2.	DDAVP bei Patienten mit Hämophilie A.	70
5.3.	DDAVP bei gesicherten, wahrscheinlichen und möglichen Konduktorinnen.	76
6.	Zusammenfassung	87
7.	Literaturverzeichnis	90

1. Einleitung.

1.1. Hämophilie A.

Die Hämophilie A ist ein x - chromosomales Leiden mit rezessivem Erbgang. Es zeichnet sich durch eine Verminderung des Faktor VIII : c im Plasma und eine typische Blutungssymtomatik mit ausgedehnten Blutungen nach Traumen und operativen Eingriffen und den charakteristischen Gelenk- und Weichteilblutungen aus. Die Häufigkeit beträgt etwa 1 Hämophilen auf 5000 männliche Neugeborene (85). Das isolierte Vorkommen der Hämophilie A ohne positive Familienanamnese wird auf 25 % - 50 % geschätzt (12, 106, 149). Diese Erstmanifestation muß als Ausdruck einer Spontanmutation im genetischen Material der Eizelle, oder als eine Spontanmutation eines der beiden Gameten, denen die Mutter des Patienten entstammt, betrachtet werden.

1.2. Rolle des Faktors VIII im Gerinnungssystem.

Faktor VIII ist zusammen mit den Faktoren XII, XI und IX nach Freisetzung von Plättchenfaktor 3 aus Thrombozyten in der 1. Phase des endogenen Systems der Blutgerinnung an der Bildung eines nicht näher definierten Faktor - X - Aktivatorkomplexes (26, 29, 58, 115) beteiligt. Somit ist Faktor VIII für den regelrechten Ablauf des Vorgangs der Bildung von Fibrin als Endprodukt der plasmatischen Gerinnung mitverantwortlich. Sein Fehlen oder seine Verminderung führt zu einer Störung des Gerinnungsablaufs mit einer Verlängerung der Gerinnungszeit und einer erhöhten Blutungsbereitschaft, die klinisch als Hämophilie A imponiert (60).

1.2.1. Diagnostik von Faktor VIII Mangelzuständen.

Für die Diagnostik der erblichen Erkrankungen mit Verminderung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität ist die Erhebung der Eigenanamnese mit Schwerpunkt auf der jeweils spezifischen Blutungssymptomatik sowie der Familienanamnese zur Abklärung einer erblichen Belastung von wesentlicher Bedeutung. Die klinische Befunderhebung kann in typischen Fällen bei Vorliegen charakteristischer Folgenzustände - etwa eines "Blutergelenkes" - ebenfalls zur Klärung der Diagnose beitragen. Als labortechnische Untersuchung wird bei der Hämophilie A die Bestimmung der Faktor VIII Konzentration im Plasma durchgeführt. (2, 66, 67, 121, 146). Als weiteres, insbesondere differentialdiagnostisch verwendbares Kriterium wird die Bestimmung der Konzentration des Faktor VIII assoziierten Antigens herangezogen. Diese Untersuchung wird außerdem zum Nachweis des Konduktorinnenstatus bei Müttern von hämophilen Söhnen, sowie weiteren weiblichen Angehörigen verwandt.

Die bislang durchgeführte Art der Diagnosestellung des Konduktorinnenstatus mittels Bestimmung der Gerinnungsaktivität im Plasma von weiblichen Verwandten von Patienten mit Hämophilie A war mit einem hohen Unsicherheitsfaktor belastet. Ein großer Teil der Konduktorinnen besitzt normale bzw. im unteren Normbereich liegende Werte für die Faktor VIII Gerinnungsaktivität (7, 12, 13, 47, 49, 77, 85, 105, 114, 139).

Die zusätzliche Bestimmung der Konzentration des Faktor VIII assoziierten Antigens brachte eine wesentliche Verbesserung der Aussagekraft. Der Vergleich von Gerinnungsaktivität und Antigenkonzentration erlaubt die Stellung der Diagnose mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 82 - 95 % (12, 21, 23, 35, 96, 149). Eine entsprechende Belastungsuntersuchung könnte unter Umständen eine noch bessere Aussagekraft über den Konduktorinnenstatus besitzen.

1.2.2. Therapie bei Faktor VIII Mangelzuständen.

Die Therapie der Hämophilie A erfolgt durch Substitution des fehlenden Faktor VIII in Form von Frischblut, Frischplasma oder Faktor VIII Konzentraten. Der Faktor VIII Gehalt der verwendeten Substitutionspräparate weist z.T. erhebliche Schwankungen auf, was nur eine relativ suffiziente Therapie zur Folge hat und die langfristige Substitutionstherapie erschwert. Die ständig drohende Hepatitis birgt eine nicht zu unterschätzende Gefahr für alle Patienten. Deshalb wurde der Stimulationstherapie mit DDAVP ein besonderes Interesse geschenkt (10). Es brachte jedoch nur für eine Teilgruppe den gewünschten Erfolg, da sich schwere Hämophilie A Patienten nicht ausreichend stimulieren ließen.

1.2.3. Physiko - chemische Eigenschaften.

Das Faktor VIII Molekül ist ein komplexer Eiweißkörper mit einem Molekülgewicht von 1-2 x 10^6, je nach Untersucher und Art der angewandten Untersuchungstechnik (11, 33, 59, 84, 116, 128, 129). Seine Plasmakonzentration beträgt 1-2mg/l bei Normalpersonen (14). Die Halbwertzeit der Faktor VIII Gerinnungsaktivität ist kürzer als die des Faktor VIII assoziierten Antigens (8-16 Stunden) (14, 31, 50, 73, 107, 110). Es gilt als gesichert, daß das Molekül aus mindestens zwei verschiedenen Untereinheiten besteht (22, 64, 90, 95, 124, 145). Dissoziationsexperimente (21, 32, 33, 55, 103, 118, 143) zeigen, daß der Komplex in zwei Komponenten zerfällt, die sich im Molekulargewicht und ihrem biologischen Verhalten voneinander unterscheiden lassen. Chromatographische Untersuchungen (11, 54, 60, 84, 103, 129) erlauben

die Zuordnung der gerinnungsaktiven Komponente zu der niedermolekularen Untereinheit (Molekulargewicht 22000 - 300000). Die hochmolekulare Untereinheit zeigt hingegen keine Gerinnungsaktivität (33, 103, 118, 143, 144). Sie soll die Funktion eines in Bezug auf die Gerinnungsaktivität inerten Trägerproteins ausüben (33) und reagiert mit heterogenen Antikörpern in Form von sichtbaren Immunpräzipitaten (58, 61, 63, 68, 94, 109). Dem Faktor VIII - Komplex wird die Beteiligung am "intrinsic system" der plasmatischen Gerinnung (Faktor VIII Gerinnungsaktivität) und die Präzipitation mit spezifischem Kaninchen - Antiserum (Faktor VIII assoziierter - Antigen - Gehalt zugeschrieben (65). Daraus bleibt zu folgern, daß der Faktor VIII-Komplex aus einer kleinen, gerinnungsaktiven, niedermolekularen Untereinheit und einem Trägerprotein mit hohem Molekulargewicht zusammengesetzt ist.
Das Trägerprotein besteht seinerseits aus sulfhydrylbrückengebundenen Untereinheiten. Das Trägerprotein ist mit der gerinnungsaktiven Komponente durch elektrostatische und hydrophobe Kräfte verbunden (84, 90, 129).

1.2.4. Synthese und Speicherung des Molekulkomplexes.

Wie aus klinischen Beobachtungen (19, 99) Transplantationsstudien (93, 142), Beobachtungen an perfundierten, isolierten Organen (37, 38, 39), Organextrakten (4, 18) und Zellkulturen (147, 148) geschlossen wurde, erfolgt die Synthese des Faktor VIII Moleküls in Leber, Milz, Niere, Knochenmark, in den Zellen des Retikulorendothelialen Systems, in Plasmazellen, Leukozyten, Lymphozyten und Fibroblasten der Haut.

Gruson und Rizza konnten mit der indirekten Immunofloreszenztechnik das Faktor VIII assoz. Antigen in allen Körpergeweben auf der Intima von Gefäßen in Verbindung mit Endothelzellen nachweisen, so daß diese zumindest als Speicherort für Faktor VIII angesehen werden.

1.3. Faktor VIII c und VIIIAG bei Normalpersonen

Die Gerinnungsaktivität liegt bei Normalpersonen zwischen 50 % und 200 % (15, 57, 74). Die Konzentration des Faktor VIII assoz. Antigens schwankt zwischen 60 % und 190 % (62, 68) d.h., daß sich beide ungefähr wie 1:1 zueinander verhalten. Der Quotient VIIIc / VIII AG beträgt _1,0 (111). Dabei sind geringe Abweichungen nach unten nicht auszuschließen.

1.3.1. Schwankungen von VIII:c und VIII:AG unter Berücksichtigung physiologischer und pathologischer Zustände bei Normalpersonen.

Die Faktor VIII Gerinnungsaktivität und die Konzentration des Faktor VIII assoziierten Antigens zeigen bei Normalpersonen in Bezug auf ihre Plasmakonzentration eine enge Korrelation. Auch unter körperlicher Belastung (8, 37, 42, 52, 70) in der Schwangerschaft (134), in der postoperativen Phase (8, 36) und nach Adrenalininfusion (36) erfolgt ein gemeinsamer Anstieg beider Konzentrationen. Der Anstieg unter körperlicher Belastung beruht möglicherweise auf der Ausschüttung von Faktor VIII aus der Milz (3, 108) bzw. der Intima (56, 120).
Der nach der Arbeit erfolgende relativ schnelle Abfall der Faktor VIII Aktivität läßt bei einer Halbwertzeit von 4 - 5 Stunden auf eine ver-

minderte Stabilität des Moleküls schließen (48, 109). Eine erhöhte Faktor VIII Aktivität findet sich auch bei hämolytischer Anämie (40), chronischer Lebererkrankung, chronisch kompensiertem Verbrauch (133), Hyperthyreose (45), Diabetes mellitus (43), so wie vor allem bei Einnahme von oralen Kontrazeptiva (34, 44). Während des Gerinnungsvorganges vermindert sich die Faktor VIII Gerinnungsaktiviät aus dem Plasma, während das Antigen noch längere Zeit nachweisbar bleibt (150).

1.4 Faktor VIII bei Patienten mit Hämophilie A.

Die Faktor VIII Gerinnungsaktivität liegt bei Patienten mit Hämophilie A je nach Schweregrad der Erkrankung zwischen weniger als 1 % bis 45 %. Man unterteilt in folgende Schweregrade:

Unter 1 % = schwere Hämophilie
1 %-5 % = mittelschwere Hämophilie
5 %-15 % = leichte oder milde Hämophilie
15% -45 % = Subhämophilie

Der Schweregrad der Blutungsneigung ist direkt vom Faktor VIII:c Gehalt abhängig (113). Das Faktor VIII assoziierte Antigen ist nicht erniedrigt oder liegt zuweilen sogar oberhalb der Normgrenze (4, 53, 69, 76, 83, 94, 128, 132). Häufig unterscheidet es sich nicht von in Normalplasmen zu findenden Werten (20, 150).

Die Hämophilie A Patienten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Je nach Anwesenheit oder Fehlen einer antigenen Determinante, die einen spezifischen homologen Antikörper neutralisieren kann, unterteilt man in A+ oder A- Hämophilie. Dies hat jedoch für die Therapie keine Bedeutung.

1.5 Faktor VIII bei Konduktorinnen.

Die überwiegende Zahl der Konduktorinnen für Hämophilie A besitzt normale Werte für den Gehalt des Faktor VIII assoz. Antigens (6, 7, 12, 35) und eine im Durchschnitt gegenüber der Norm reduzierte Gerinnungsaktivität (12, 21, 149). Ein jedoch nicht unerheblicher Teil der Konduktorinnen kann eine Faktovr VIII:c Konzentration im Bereich der Norm aufweisen (13, 47, 49, 77, 85, 114). Das Verhältnis von Gerinnungsaktivität zur Antigenkonzentration ergibt sich, entsprechend der Lyon - Hypothese (87) aus dem jeweiligen Ausmaß der zufälligen Aktivierung oder Inaktivierung des Genortes auf dem betroffenen, veränderten x - Chromosom, der für die Synthese des Faktor VIII Moleküls, der gerinnungsaktiven Komponente, verantwortlich ist. Als Extremfall wird die hämophilie ähnliche Blutungssymptomatik bei weiblichen heterozygoten Personen gewertet (92).

Ein im Hinblick auf die regelrechte Faktor VIII Synthese verändertes x Chromosom liegt vor

1) obligatorisch bei Müttern von Patienten mit Hämophilie A mit einer positiven Familienanamnese (d.h. Töchter von Hämophilien, Mütter von mehr als einem hämophilen Sohn oder Mütter von Hämophilen mit weiteren Fällen dieser Erkrankung in der Familie)
   "gesicherte Konduktorin"
2) u.U. bei Müttern von hämophilen Patienten ohne nachweisbare familiäre Belastung, verursacht durch eine Spontanmutation im genetischen Material der Mutter
   "wahrscheinliche Konduktorin"
3) möglicherweise bei Schwestern von Hämophilen mit einer Wahrscheinlich-

keit von 25 %

"mögliche Konduktorin".

1.6. Weitere Gerinnungsparameter.

Die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) ist ein globaler Test für die Kontrolle der im endogenen Gerinnungssystem wirksamen Faktoren (I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII). Gerinnungszeiten über 55 sec. deuten auf eine Gerinnungsstörung hin und erfordern detaillierte Untersuchungen, insbesondere der Faktoren VIII und IX. Der PTT-Test ermöglicht es, potentielle Bluter rasch zu ermitteln, um sie vor einem chirurgischen Eingriff unter besonderen therapeutischen Schutz stellen zu können (117). Es ist von Interesse, ob der Globaltest auch unter Stimulationsbedingungen gilt.

Hämophilie A-Patienten weisen gerinnungsphysiologisch gesehen relativ schlechte Bedingungen auf. Da der Fibrinogengehalt bei sehr vielen fibrinolytischen Krankheitszuständen vermindert ist und das Plasma Fibrin/Fibrinogen Spaltprodukte enthält, kann die Thrombinzeit auch als Maß für die Fibrinolyseintensität herangezogen werden (117). Es ist schließlich von Interesse, wie sich diese Gerinnungssubstanz Fibrinogen unter der Stimulation mit DDAVP verhält, um den gerinnungsphysiologischen Zustand z.B. bei Hämophilie A-Patienten zu verbessern.

1.7 Das Pharmakon DDAVP und seine klinische Anwendung.

DDAVP ist ein neurohypophyseal aktives Hormon mit der chemischen Zusammensetzung 1 - Deamino - 8 - D - Argeninvasopressin. Es diente bislang der Therapie des Diabetes insipidus und bewirkt eine Reduktion des Urin-

volumens. Im wesentlichen wird die tubuläre Konzentrationsfähigkeit der Nieren gesteigert. Die Möglichkeit der nasalen Applikation macht in vielen Fällen die Handhabung des Medikamentes für die Patienten angenehm und einfach (71, 88, 89, 102, 125, 137).

1.7.1 DDAVP induzierte Veränderungen der Gerinnungsparameter.

a) Stimulation von Faktor VIII Gerinnungsaktivität (VIII:c) nach Gabe von DDAVP.

DDAVP bewirkt einen Anstieg von Faktor VIII:c, der von der endogenen Ausgangsaktivität abhängig ist. (88, 89, 101). Ist die Ausgangsaktivität geringer als 1 % konnte keiner bzw. nur ein geringfügiger Anstieg von Faktor VIII:c ermittelt werden. Bei Werten zwischen 2 - 10 % beträgt der Anstieg etwa das 2 - 3 fache und bei Ausgangswerten von 10 - 70 % beträgt die Steigerung von Faktor VIII:c das 4 bis 6 - fache. Bei Normalpersonen ließ sich wiederum nur ein Anstieg um das 2 bis 3 fache feststellen. Bei diesen Aussagen handelt es sich um Mittelwerte. Starke Abweichungen deuten auf verschiedenartige Hämophilieformen hin (127, 135).

Die Abklingrate des DDAVP stimulierten Faktor VIII:c soll der des von antihämophilen Globulins entsprechen, ohne daß jedoch genaue Angaben hierzu gemacht wurden (88, 89, 101, 102).Auffällig ist jedoch, daß 12 - 24 Stunden nach DDAVP Gabe die Faktor VIII:c Konzentration nicht selten unter den Ausgangswerten absinkt (137).

b) DDAVP Stimulation von Faktor VIII assoz. Antigen (VIII:AG).

Im allgemeinen wurde ebenfalls ein Anstieg von Faktor VIII:AG gefunden (88, 89, 101, 125, 137). Bei Normalpersonen wurde von Mannucci und Nilsson entdeckt, daß der Anstieg von Faktor VIII:AG innerhalb von

Minuten zu verzeichnen ist, sein Maximum bei 30 bis 120 Minuten liegt und der Ausgangswert nach 24 Stunden wieder erreicht ist (88, 89, 102). Weiterhin wurde beobachtet, daß Faktor VIII:c und VIII:AG getrennt stimuliert werden (89, 101, 102).

c) DDAVP induzierte Veränderung des PTT.

Im allgemeinen fand man eine Verkürzung der PTT nach DDAVP Gabe, die aber nicht in allen Fällen mit dem Anstieg des Faktor VIII:c korrellierte (127).

d) DDAVP Stimulation der Fibrinolyse.

DDAVP besitzt nur geringfügige fibrinolytische Eigenschaften. Es ist vergleichbar mit der Fibrinolyse bei mäßigem Training. Bei der Dosierung von 0,4 µg/kg fand Aberg eine Fibrinolyse nach 20 Minuten, die der einer venösen Stauung entspricht (1, 46).

1.7.2. Dosierung und Anwendung von DDAVP bei Blutern.

Ein dosisabhängiger hämostatischer Effekt ist bei einer Dosierung zwischen 0,2 - 0,6 µg/kg Körpergewicht zu erwarten. Am häufigsten wurde DDAVP bisher bei der leichten und mittelschweren Hämophilie angewandt. Mannucci vertrat die Ansicht, daß kleinere Operationen bei mehr als 10 % durchführbar seien. Die Stimulierbarkeit des VIII:c bei niedrigen Werten erschien zu gering (88, 135, 136, 138).

1.8. Zielsetzung.

Bisher sind nur relativ wenige Fälle beschrieben worden, bei denen der gerinnungsphysiologische Effekt von DDAVP untersucht wurde. Für eine

Bewertung kommt erschwerend hinzu, daß uneinheitliche Dosen, unterschiedliche Abnahmezeitpunkte und Auflösungsvolumina von den verschiedenen Autoren genannt wurden. Die Auswirkung von DDAVP bei Konduktorinnen für Hämophilie A war nur bei einer sehr geringen Anzahl genauer betrachtet worden. Wegen der methodischen und technischen Variablen ist der Vergleich zwischen Normalpersonen, Konduktorinnen und Hämophilen nicht möglich. Um jedoch eine eindeutige Aussage machen zu können, wurde in dieser Arbeit folgendes Ziel angesteuert.

Es soll bei max. Stimulierung unter standardisierten Bedingungen auch unter Einschluß einer Doppelblindstudie und genügend langer Beobachtungszeit eine Aussage zur Kinetik von VIII:c und VIII:AG gemacht werden. Diese unter standardisierten Bedingungen erhobenen Normalwerte sind Grundlage für die Beurteilung eines möglichen therapeutischen Effekts bei Hämophilen im blutungsfreien Intervall oder auch im Rahmen notwendiger Zahnextraktionen. Weiterhin soll geprüft werden, ob durch DDAVP-Belastung die Aussagekraft des gerinnungsphysiologischen Nachweises auf Konduktorinnenstatus weiter erhöht werden kann.

2. Untersuchungsaufbau

Als gesunde Normalpersonen standen 6 Medizinstudenten im Alter von 22 - 26 Jahren zur Verfügung; 3 von ihnen waren weiblichen Geschlechts. Alle hatten in den letzten 3 Wochen keine Medikamente -- insbesondere Ovulationshemmer -- eingenommen. Nach Lagerung auf einer Untersuchungsliege und einer 15 minütigen Ruhepause wurde zuerst 6 gesunden Probanden 0,5 µg/kg DDAVP gelöst in 50 ml 0,9 %iger Na Cl Lösung über die Dauer von 30 Minuten kontinuierlich mittels Perfusor infundiert. Vom anderen Arm wurde zu den standardisierten Zeiten und zwar vor Infusionsbeginn sowie 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten nach Infusionsbeginn Zitratblut für die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität, des Faktor VIII assoziierten Antigens, der partiellen Thromboplastinzeit und des Fibrinogengehaltes entnommen.

Um unspezifische Effekte wie z.B. Stress, das eine Faktor VIII Ausschüttung bewirkt, auszuschließen, wurde ein Doppelblindversuch in oben beschriebener Verfahrensanordnung mit 12 gesunden Normalpersonen durchgeführt. Von diesen waren 3 Personen weiblichen Geschlechts. Als Placebo diente physiologische Kochsalzlösung als Minirin (DDAVP) verpackt.

Um Aufschluß über die Resorbierbarkeit des DDAVP durch die nasalen Schleimhäute zu erhalten, wurde abweichend von der obigen Verfahrensanordnung einer dritten Untersuchungsgruppe von 6 gesunden Probanden je 100 µg DDAVP nasal verabreicht. Dies geschah in Kopfseitenlage, wobei die Menge DDAVP jeweils zur Hälfte mittels Injek-

tionsspritze in ein Nasenloch gefüllt und dieses im Anschluß daran für 15 Minuten durch Druck verschlossen wurde. Auch hier wurden die gleichen Gerinnungsuntersuchungen durchgeführt.

Der spezifische Einfluß des Vasopressin auf den Gerinnungsstatus, speziell Faktor VIII (25, 89, 112) gab die Veranlaßung 7 Hämophilie A Patienten bei Beachtung obiger Bedingungen unter intravenöser Applikation von DDAVP auf die vier Parameter (F.VIIIc, VIII AG, PTT, Fibrinogen) zu untersuchen. Die Patienten im Alter von 8 - 14 Jahren litten unter mittelschwerer Hämophilie A, wobei 3 von ihnen DDAVP als Prämedikation zu einer Zahnextraktion erhielten.

Da sich bei Konduktorinnen für Hämophilie A gewöhnlich ein erniedrigter Faktor VIII Spiegel zeigt und ihre Diagnostik besondere Schwierigkeiten bereitet, führten wir bei 3 gesicherten, 6 wahrscheinlichen und 6 möglichen Konduktorinnen einen Belastungstest mit DDAVP unter oben genannten Bedingungen und unter Ermittlung der vier Gerinnungsparameter durch. (12, 51, 96, 149).

3. Material und Methoden

3.1. Gewinnung von Normal- und Patientenplasma

Zum Zweck der sechsmaligen Blutentnahme (0', 15', 30', 60' 120', 240') wurde den Probanden ein SURFLO Infusion - Set (Terumo Corporation Tokyo) an die Vena Cubitalis des rechten Armes angelegt. Diese saubere und schonende Punktion der Vene vermied eine extravasal induzierte Gerinnung. Mit 250 ml einer 0,9 %igen Kochsalzlösung wurde das Blutentnahmesystem offengehalten. Das zu den festgesetzten Zeiten mittels Plastikspritzen entnommene Blut (10ml) wurde unter Vorgabe von 3,8 %igem Natriumcitrat im Mischverhältnis 1 : 10 dekalzifiziert.

In Plastikröhrchen abgefüllt und anschließend bei 3000 U/min über 10 Minuten zentrifugiert ergab sich das für die Gerinnungsuntersuchung gewünschte Plasma, welches zu je 2 ml in Eppendorf Reaktionsgefäße abgefüllt wurde. Zur Vermeidung des Aktivitätsverlustes wurde das Plasma bis zur weiteren Verarbeitung bei -25°C eingefroren.

3.2. Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität

Die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität erfolgte mittels eines von Langdell 1953 (83) zuerst beschriebenen und von O.Egeberg 1962 (41), Hardisty und Macpherson 1977 (57) modifizierten Einphasen-Cephalintestes unter Verwendung handelsüblicher Reagenzien (Firma Immuno Diagnostika GMBH Mannheim).

Verwendet wurden folgende Reagenzien:

Faktor VIII Mangelplasma, lyophilisiert, in 2 ml Aqua dest aufzulösen.

Phospholipid Kaolin (Cephalin) lyophilisiert, in 1 ml Aqua dest zu suspendieren.

Calciumchloridlösung 50 mmol/l, 5 ml.

Das Mangelplasma war natürlicher Herkunft und auf Freiheit von Aktivatoren und Inhibitoren geprüft.
Phospholipid dient als Oberflächenaktivator und gewährleistet somit eine konstante Kontaktaktivierung des dekalzifizierten Plasmas (83).

Die lyophilisierten Reagenzien wurden unmittelbar vor Durchführung des Tests in der vorgeschriebenen Menge Aqua dest. aufgelöst, bzw. suspendiert und laut Versuchsvorschriften der Firma Immuno bis zur Verwendung 15 Minuten stehen gelassen. Während der Testdauer wurden die aufgelösten bzw. suspendierten Reagenzien im Eisbad aufbewahrt. Die Phospholipidsuspension ist unmittelbar vor Gebrauch zu schütteln, während die Calciumchloridlösung bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt wird. Unter Beachtung dieser Vorschriften sind alle Reagenzien ohne Aktivitätsverlust 2 Stunden haltbar.

3.2.1. Durchführung des Tests:

0,1 ml Faktor VIII Mangelplasma

0,1 ml Phospholipid Kaolin

0,1 ml Probanden-bzw. Patientenplasma

Inkubation über 4 Min. im Wasserbad bei 37°C

o,1 ml CaCl Lösung 50 mmol/l

Die Stoppuhr wurde bei Zugabe der Kalziumlösung gestartet und nach 30 sec. Inkubationszeit mit dem Häkeln begonnen. Die Gerinnungszeit war definiert als die Zeit von der Rekalzifizierung nach Zusatz des CaCl bis zum Auftreten des ersten sichtbaren Fibringerinnsels. Die Bestimmung erfolgte im Wasserbad bei 37°C mittels eines Platinhakens in einem Plastikröhrchen (Häkchenmethode).

Zur Ermittlung der prozentualen Faktor VIII Aktivität wurde für jede Reagenziencharge eine Eichkurve ermittelt, da jede Charge eine Reaktionszeitdifferenz von ± 3 % beinhalten kann. Das hierfür benötigte Faktor VIII - 100 % - Referenzplasma der Firma Immuno bestand aus stabilisiertem und lyophilisiertem Plasma, welches aus ausgewählten Normalcitratplasmen von mindestens 30 Spendern hergestellt wurde. Um die Koordinationspunkte (Reaktionsfestzeiten) für die Eichkurve zu erhalten, wurde Referenzplasma entsprechend den Testvorschriften im Verhältnis 1 : 1 (100 %), 1 : 2 (50 %) und 1 : 10 (10 %) mit Mangelplasma verdünnt. Die Reaktionszeiten in Sekunden des entsprechend verdünnten Referenzplasmas, ermittelt nach obigem Testansatz, wurden 8 - fach bestimmt. Das arithmetrische Mittel aus den erhaltenen Werten wurde errechnet und gegen die Verdünnung ausgedrückt in % der Norm auf doppeltlogarithmischem Papier aufgetragen.

3.3 Bestimmung des Faktor VIII assoziierten Antigens (F. VIII ass. AG, VIII AG)

Das Faktor VIII ass. AG wurde nach der von Laurell (82) beschriebenen und von Kokemohr (79) modifizierten quantitativen Immunelektrophorese in einem "Anti - Human - Faktor VIII Kaninchenserumhaltigen" Agarosegel bestimmt. Die Antiserumkonzentration im Gel betrug jeweils

0,83 %.

Herstellung des antiserumhaltigen Agarosegels.

Verwandte Reagenzien:

Na-Barbitalpuffer bestehend aus:

Barbital Na		131,4 g
Barbital		20,8 g
Aqua dest	ad	10,0 l

Agarose:

SO_4H^{1+} - Gruppen	0,03 mVal/g
CO_3^{2-} - Gruppen	0,2 mVal/g

1 g Agarose wurde zur Erzielung eines 1 % igem Agarosegels mit ausreichender mechanischer Festigkeit, mit 100 mol Na - Barbitalpuffer, pH 8,6, Ionenstärke 0,075 mol aufgefüllt. Diese Suspension wurde unter ständigem Rühren im Wasserbad erhitzt, bis die Agarose aufgelöst war und die Flüssigkeit klar erschien. Die nicht sogleich weiterverarbeitete Lösung wurde in Portionen zu 30 ml abgefüllt und nach Vorschrift im Kühlschrank bei + 4 - + 8° C gelagert.

Zwischen zwei Glasplatten, die zuvor mit Wasser und Äthanol gereinigt wurden (Größe 20,5 cm x 11 cm), wurde ein U-Rahmen von 1,5 mm Stärke eingelegt und die Platten mit dazwischenliegendem U-Rahmen (Gelvolumen 29,5 ml) mit Bulldogklammern verklammert. Zu den 30 ml der 1 % igen Agaroselösung wurden bei einer Temperatur von 56 °C 250 Mikroliter des Anti - Human-Faktor VIII - Kaninchenserums CLOTIMMUN AHG-assoz. Protein der Firma Behring hinzugefügt, gut durchgemischt und die Lösung mit einer Pipette zwischen die leicht erwärmten Glasplatten gegossen. Die Erwärmung der Glasplatten, jedoch nicht über 56° C, erleichterte den Guß einer luftblasenfreien Agaroseplatte. Luftblasen behindern die Diffusion und

damit die Ausbildung sauberer kerzenflammenartiger Präzipitate.

Nach Abkühlung und Erstarren des Agarosegels konnte eine Glasplatte und der U - Rahmen entfernt werden und das Gel unter Belassung auf der anderen Glasplatte für mindestens 15 Minuten in einer feuchten Kammer ruhen. In die so erhaltene Gelplatte wurden anschließend mit einer Stanzkanüle (Ø 2,5 mm) unter Zuhilfenahme einer Stanzschablone 24 Löcher ausgestanzt und die überflüssigen Gelzylinder mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.
Die Beschickung der Stanzlöcher erfolgte mit 5 Mikroliter des zu untersuchenden Plasmas, das je nach Ausgangskonzentration unverdünnt oder im Verhältnis 1 : 2 oder 1 : 4 mit 0,9 %iger Na Cl-Lösung verdünnt verwendet wurde, mittels Partigen-Dispensor (Behring-Werke, Marburg).

3.3.1. Elektrophoresekammer:

Die Elektrophoresekammer der Firma Boskamp bestand aus einem Horizontaltisch mit Drahtgitterabdeckung, einer Gegenstromkühlplattform als Unterlage für die Glasplatten mit dem Agarosegel, zwei Kunststoffpuffertrögen, Fassungsvermögen ca. 700 ml, den entsprechenden elektrischen Zuleitungen, einem Gleichrichter und dem Netzanschluß. Die Gegenstromkühlplattform wurde mittels Wasser aus einem Eintauchkühlsystem der Firma Haake auf 15°C eingestellt. Die Puffertröge wurden mit Na-Barbitalpuffer, pH 8,6, Ionenstärke 0,075 beschickt und bei einer Elektrophoresedauer von 18 Stunden eine Spannung von 75 V, je nach Qualität des Puffers und eine Stromstärke zwischen 160 - 180 mA gewählt. Um eine Ionenwanderung und die damit verbundene Präzipitatausbildung zu gewährleisten, wurde der Puffer in den Trögen durch 1 mm starkes Fliespapier zur Kammersättigung (Firma Comag, Muttenz Schweiz) mit dem

Agarosegel verbunden. Der Abstand zwischen den Fliespapierstreifen auf der Agarose betrug ca. 6 cm, welches weit über der möglichen Wanderungsstrecke des Serums im Agar lag.

Weitere Behandlung der Agaroseplatten:
(Wässern, Trocknen, Färben)

Erforderliche Reagenzien:

Na Cl Lösung 0,9 %ig

Färbelösung:

Coomassie-Brilliant-Blue		5 g
Äthanol	96 %	450 ml
Eisessig		100 ml
Aqua dest		450 ml
(Vor Gebrauch filtrieren)		

Entfärbelösung:

Äthanol	96 %	450 ml
Eisessig		100 ml
Aqua dest.		450 ml

Nach 18 stündiger Laufzeit der Elektrophorese wurden die Gelplatten mindestens 10 Stunden in mehrfach gewechselter jeweils frischer 0,9 %iger Na Cl-Lösung gewässert, um alle löslichen Proteine zu entfernen, die sonst bei anschließender Färbung die Immunpräzipitate überlagern wurden. Nach Entfernung jeglicher löslicher Proteine wurden die Platten mit Filterpapier überdeckt und bis zur vollständigen Eintrockung der Gelschicht in der Luft langsam getrocknet. Danach konnte das Filterpapier unter Zugabe von Wasser vorsichtig entfernt und die Platten über 15 Minuten in Coomassie Brilliant-Blue-Färbelösung gelegt werden. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend mit einer Entfärbelösung entfernt.

Die Immunpräzipitate erschienen als kerzenflammenähnliche Gebilde.

3.3.2. Auswertung der Platten und Berechnung der Konzentration des Faktor VIII ass. AG.:

Alle untersuchten Plasmen wurden auf einen Standard bezogen. Als Standard diente das gepoolte Plasma von 10 gesunden Spendern (5 Frauen, 5 Männer; im Alter von 20 - 40 Jahren). Die Konzentration des Faktor VIII ass. AG dieses Pools wurde als 100 % der Norm festgesetzt. Diese Festsetzung erfolgte willkürlich. Der Plasmapool wurde alle fünf Monate erneuert, um einen Verlust der imunologischen Aktivität von Faktor VIII ass. AG auszuschließen. Jegliche Plasmen wurden im Verdünnungsverhältnis 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, angesetzt, um ein sauberes und spitzausgelaufenes kerzenflammenförmiges Präzipitat zu erhalten. Diese Verdünnungen entsprachen 100 %, 50 %, 25 % der Ausgangsaktivität.

Auf jeder Agaroseplatte wurde der Plasmapool mit angesetzt, um durch Berechnungsfehler induzierende Umwelteinflüsse wie z.B. Witterung oder Beschaffenheit des Puffers nach Möglichkeit zu vermeiden.

Zur Erstellung der Eichgraden wurden die Längen der Poolpräzipitate durch ein Ablesegerät von Behring ermittelt, in mm gegen die Verdünnung in Prozent auf doppeltlogarithmischem Papier aufgetragen und eine Gerade hindurchgelegt, auf der die jeweiligen Konzentrationen des Faktor VIII ass. Ag. abgelesen werden konnten. Ein Ablesen der Aktivität über 100 % war nach von Kries (80) durch Interpolation der Meßwerte und Verlängerung der Eichgraden möglich. Da die Präzipitatlängen des Poolplasmas an verschiedenen Tagen differierten, wurde die Erstellung einer Eichkurve pro Agaroseplatte notwendig.

3.4. Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT).

Die partielle Thromboplastinzeit wurde nach der von Langdell (83) 1953 entwickelten Methode bestimmt. Die PTT-Zeit erfaßt global die Bildung des Plasmathromboplastins. Sie ermöglicht eine Kontrolle der im endogenen Gerinnungssystem wirksamen Faktoren (I, II, IX, X, V, VIII, XI, XII). Das PTT Reagenz bestand aus isolierten und gewaschenen Human - Thrombozyten mit einem Zusatz von Kaolin.

Erforderliche Reagenzien:
PTT Reagenz (Firma Behring)
Calciumchlorid - Lösung 1/40 mol/l.

Der Inhalt einer Kapsel PTT Reagenz wurde in ein sauberes Reagenzglas gefüllt, 6 ml Aqua dest. hinzugegeben und gründlich mit einem Glasstab suspendiert. Diese Suspension wurde unmittelbar vor jeder Entnahme umgerührt und täglich frisch angesetzt.

3.4.1. Durchführung des Testes:

0,2 ml dieser Suspension und 0,2 ml des dekalzifizierten Patientenplasmas wurde zusammengegeben und zur vollständigen Aktivierung des endogenen Gerinnungssystems genau 2 Minuten im Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt. Anschließend wurden 0,2 ml der auf 37 Grad Celsius vorgewärmten Calziumchloridlösung hinzupipettiert und die Rekalzifizierungszeit (PTT-Zeit) unter ständigem häkeln (Platindraht) mit der Stoppuhr gemessen. (Normalwert 35 - 55 sec.)
Dem raschen Aktivitätsverlust der Faktoren vorzubeugen, wurde das Plasma innerhalb 2 h nach der Blutentnahme bzw. dem Auftauen verarbeitet.

3.5. Bestimmung des Fibrinogengehaltes im Plasma.

Das Fibrinogen wurde gerinnungsphysiologisch nach der von Clauss 1957 beschriebenen Methode (30) bestimmt. Sie basiert auf der Tatsache, daß bei einer schwachen Fibrinogenlösung (verdünntes Plasma) und einer konzentrierten Thrombinlösung ein Gerinnungssystem vorhanden war. Dieses Gerinnungssystem reagierte einerseits sehr empfindlich auf unterschiedliche Fibrinogenkonzentrationen, andererseits sehr wenig empfindlich auf Schwankungen der Thrombinkonzentration. Die Wirkung des Antithrombins konnte dankder hohen Thrombinkonzentration und der Verdünnung des Plasmas vernachlässigt werden. Die ermittelte Thrombinzeit ermöglichte somit in erster Linie die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration.

Verwandte Reagenzien:

Thrombin-Reagenz (Roche-Diagnostica)

Es enthält 120 NIH-U lyophilisiertes Rinder-Thrombin pro Fläschen.

Barbituratpuffer (Michaelispuffer) pH 7,3

Kontrollcitratplasma normal (Roche Diagnostica).

3.5.1. Durchführung des Testes:

Das Patientenplasma wurde 1 :10 mit Michaelispuffer verdünnt. 0,2 ml dieser Verdünnung wurden eine Minute bei 37 Grad Celsius vorgewärmt und unter gleichzeitigem Starten der Stoppuhr mit 0,2 ml Thrombinreagenz versetzt. Mittels eines Platinhäkchens wurde der Eintritt der Gerinnselbildung erfaßt und die Zeit auf der Stoppuhr abgelesen. Zur Erzielung einer größeren Genauigkeit wurden Mehrfachbestimmungen durch-

geführt.

Zur Bestimmung des Fibrinogengehaltes in mg/100 ml mußte eine Eichkurve erstellt werden.

Das mit 1 ml Aqua dest. aufgefüllte Kontrollcitratplasma wurde mit Michaelispuffer im Verhältnis 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 verdünnt. Von jeder Verdünnung wurde nach obigem Testablauf die Gerinnungszeit mehrfach bestimmt und nach Ermittlung des Mittelwertes auf doppellogarithmischem Papier gegen mg/100 ml (Abszisse) aufgetragen. Der auf dem Kontrollplasmafläschen deklarierte Fibrinogengehalt in mg/100 ml wurde dabei der Gerinnungszeit der 1 : 10 Verdünnung zugeordnet. Die Verbindung der so gewonnenen Koordinatenpunkte ergab als Eichkurve eine Hyperbel, auf der der Fibrinogengehalt der jeweiligen Patientenplasmen abgelesen werden konnte.

4. Ergebnisse:

4.1. Erstellung einer Eichkurve zur Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität.

Entsprechend der Anweisung der Firma Immuno für den zuvor schon beschriebenen Gebrauch der Testplasmen für die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität wurde das Referenzplasma gleich 100 % im Verhältnis 1 : 1 (100 %, 1 : 2 (50 %) und 1 : 10 (10 %) mit Faktor VIII Mangelplasma verdünnt. Die Koordinatenpunkte der Eichkurve wurden durch die dem Verdünnungsgrad entsprechenden Reaktionszeiten bestimmt. Die hierfür erhaltenen Werte der 8-fach-Bestimmungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Aus dem arithmetischen Mittel der Werte ergab sich die zugehörige Eichkurve.

Bei jedem Wechsel der Reagenzien mußte eine neue Eichkurve erstellt werden, da die Werte um bis zu ± 3,2 sec. differierten, welches in der Zusammensetzung der Reagenzien seine Ursache hat.

Der Verlauf der Kurven war stets parallel zu der in der Abb. 1 dargestellten Eichkurve.

Tab. 1: 8-fach - Bestimmung der Faktor VIII - Gerinnungsaktivität (Sekunden) von Referenzplasmaverdünnungen zur Erstellung einer Eichgraden; Mittelwert $\bar{x}$

	Verdünnung		
Nr.	1 : 1	1 : 2	1 : 10
1	50,5	57,5	76,2
2	51,0	56,8	77,1
3	51,5	56,9	75,9
4	50,3	57,6	76,5
5	51,4	57,3	76,9
6	51,3	57,2	77,2
7	50,6	56,7	76,4
8	51,4	57,7	76,8
$\bar{x}$	51,0	57,2	76,6
% d. N.	100 %	50 %	10 %

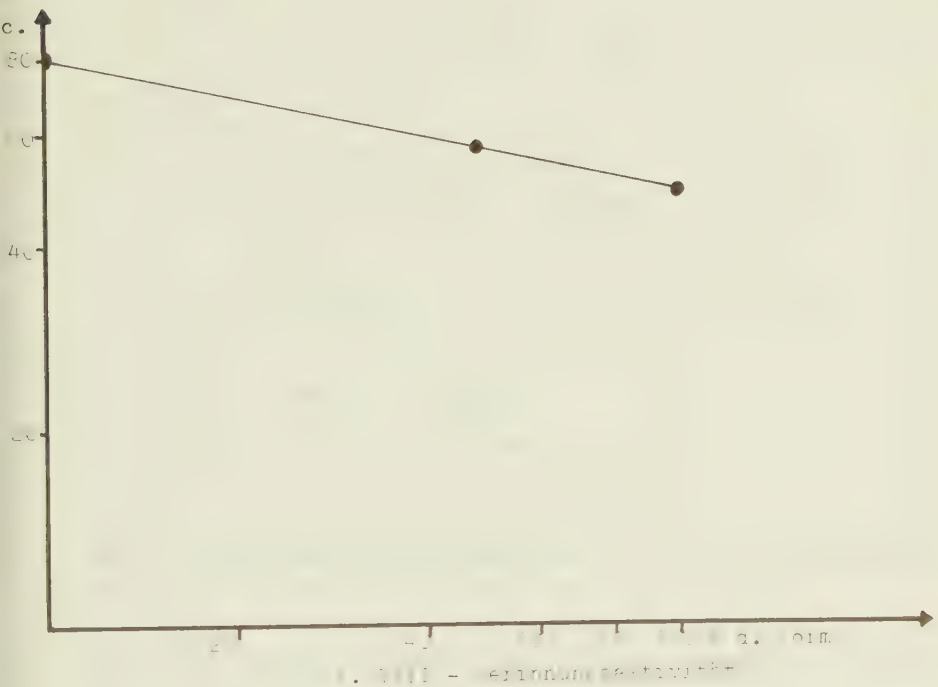

Abb. 1: Eichgrade für die Bestimmung der Gerinnungsaktivität.

4.1.1. Herstellung einer Eichkurve für die Bestimmung der Faktor VIII ass. Antigenkonzentration.

Die Bestimmung des Faktor VIII Antigens zur Gewinnung der Koordinatenpunkte für die Eichkurve erfolgte in Verdünnungen von 1 : 2 und 1 : 4 eines unverdünnt verwandten Normalplasmapools von 10 gesunden Spendern, dessen Antigenkonzentration gleich 100 %, diejenige der Verdünnungen gleich 50 % und 25 % gesetzt und auf doppeltlogarithmischem Papier aufgetragen wurde (Abb. 2)

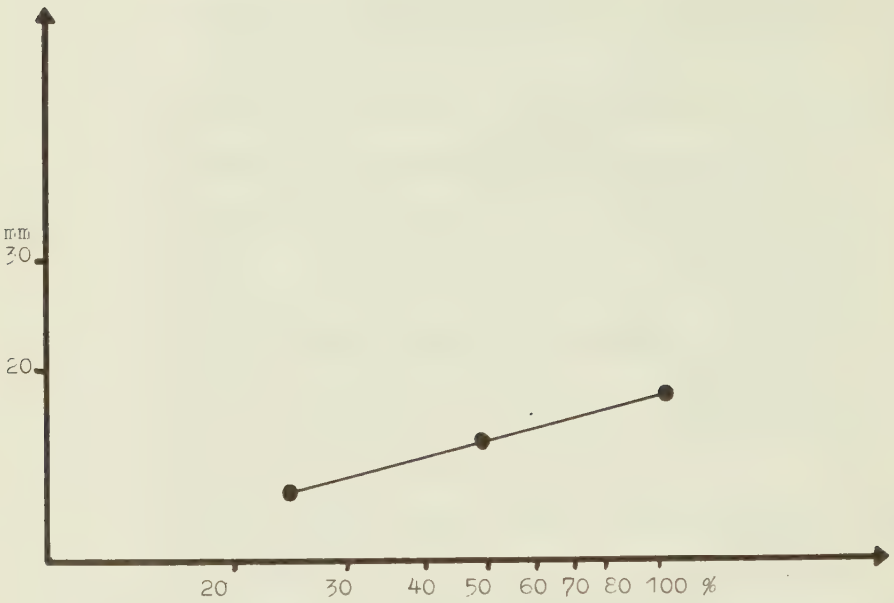

Abb. 2: Eichgrade zur Bestimmung des Faktor VIII Antigens

Bestimmungen der Konzentration des Faktor VIII assoziierten Antigens des gepoolten Normalplasmas an verschiedenen Tagen (Tab. 2) ergaben zum Teil erhebliche Abweichungen der Präzipitathöhen der jeweiligen Verdünnungswerte untereinander, während die Steigung der aus den zueinander gehörenden Werten konstruierten Geraden konstant blieb (Abb. 3). Als Ursache hierfür sind in erster Linie Schwankungen der Raumtemperatur (und damit des Puffers in den Puffertrögen), der Qualität des verwandten Puffers, der Stromstärke, der Luftfeuchtigkeit oder des Antigengehaltes im Agarosegel anzusehen.

Deshalb wurde zu jeder Agaroseplatte eine neue Eichkurve angelegt.

Als Parameter für die Antigenkonzentration wurde die Präzipitathöhe gemessen (Tab. 2).

Tab. 2: Unterschiedliche Präzipitathöhen (mm) des gleichen Plasmapools an verschiedenen Untersuchungstagen.

	Verdünnung		
Datum	1 : 1	1 : 2	1 : 4
18.08.	14,8	8,5	4,8
3.10.	17,8	12,0	7,9
11.10.	16,0	10,0	5,6
15.10.	15,1	9,8	5,2
27.10	15,7	9,9	5,7
01.11.	12,0	8,0	4,4
07.11.	16,2	10,5	6,0
22.11.	15,3	9,6	5,4

Wie aus den Untersuchungen von Kokemohr hervorgeht, ist es möglich, die Eichkurve über den 100 % - Wert hinaus zu verlängern, ohne daß sich dabei über die übliche Fehlerbreite hinausgehende Antigenkonzentrationen ermitteln lassen (79). Nur bei extrem hohem Antigengehalt speziell bei Konduktorinnen war es ratsam, zur Überprüfung der Ergebnisse und Vermeidung von Fehlern eine Verdünnung zu wählen, die das Präzipitat nur bis an den 100 %-Wert steigen ließ.

Die Antigenkonzentrationen wurden somit am unverdünnten Plasma ermittelt, wobei jedoch bei Werten über der Norm die entsprechende Plasmaverdünnung Kontrollzwecken diente.

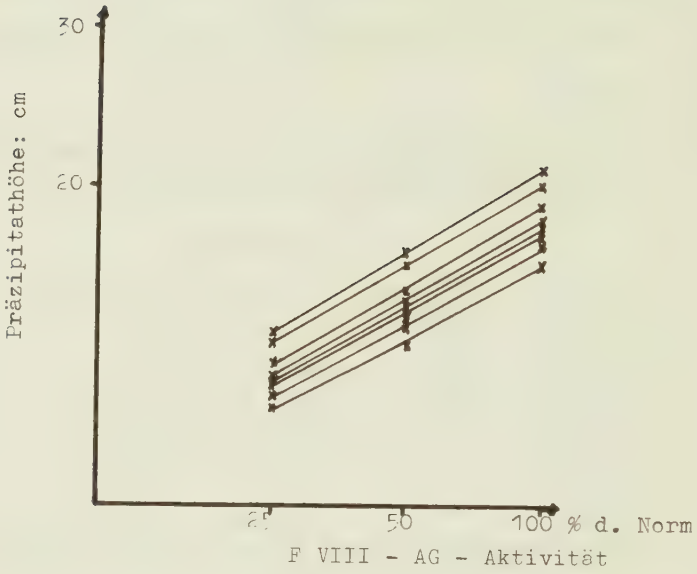

Abb. 3: Eichgraden des gleichen Plasmapools an verschiedenen Untersuchungstagen.

Abb. 3: verdeutlicht durch die Parallelität der Linien, daß Umwelteinflüsse die Präzipitatshöhe konstant verändern, aber durch Anfertigung jeweils einer Eichkurve pro Agaroseplatte keine Konzentrationsdifferenz in der Bestimmung auftrat.

4.1.2. Erstellung der Eichkurve für die Bestimmung des Fibrinogens.

Den Untersuchungsvorschriften der Firma Roche - Diagnostica folgend, wurde das mit 1 ml Aqua dest. aufgefüllte Kontrollcitratplasma jeweils in

einem getrennten Röhrchen mit Michaelispuffer im Verhältnis 1: 5, 1:10, 1:20 und 1:40 gemischt. Von jeder Verdünnung wurde nach zuvor beschriebenem Testablauf die Reaktionszeit mehrfach ermittelt und der Mittelwert errechnet (Tab. 3). Die der Verdünnung 1:10 zugehörige Gerinnungszeit wurde dem auf dem Kontrollplasmafläschchen deklarierten Fibrinogengehalt von 225 mg/100 ml auf doppeltlogarithmischem Papier zugeordnet. Die Verbindung der gewonnenen Koordinatenpunkte ergab die Hyperbel, (Abb. 4:) auf der der Fibrinogengehalt der einzelnen Patientenplasmen abgelesen wurde.

Tab. 3: 8-fach Bestimmung der Reaktionszeit (Sekunden des speziell verdünnten Standardfibrinogens (226 mg/100 ml), Mittelwert $\bar{x}$.

	Verdünnung			
Nr.	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40
1	5,6	9,4	13,7	30,0
2	5,7	9,1	13,9	29,5
3	5,6	9,5	13,8	29,4
4	5,6	9,4	13,4	29,7
5	5,4	9,3	13,5	30,1
6	5,3	9,0	13,4	29,5
7	5,5	9,2	13,6	29,7
8	5,6	9,0	13,7	29,6
$\bar{x}$	5,5	9,2	13,6	29,7
mg/100ml	450	225	112,5	56,25

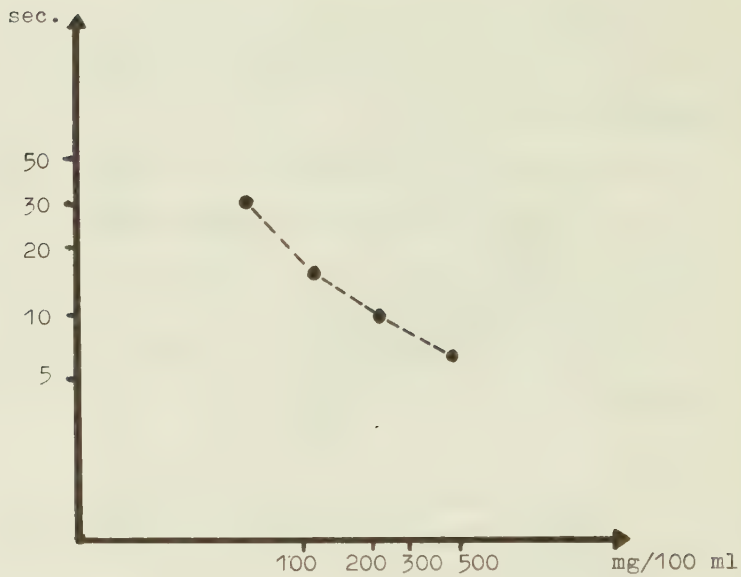

Abb. 4: Eichkurve zur Bestimmung des Fibrinogengehaltes der zu untersuchenden Plasmen.

4.2. Untersuchungen der gesunden Normalpersonen.

Zur Ermittlung der Reaktion des Gerinnungssystems speziell der Faktor VIII Gerinnungsaktivität , des Faktor VIII assoziierten Antigens, des Fibrinogens und der partiellen Thromboplastinzeit auf die 30-minütige Belastung mit DDAVP, wurden nach zuvor beschriebenem Verfahren 6 gesunde Normalpersonen untersucht.

Bei der Bestimmung der Gerinnungsaktivität von Faktor VIII wurden die Plasmen, deren Werte über 100 % lagen, soweit verdünnt, bis der abge-

lesene Wert unter 100 % und damit im Bereich der Eichkurve lag. Die außerhalb des Bereichs der Eichkurve für die Antigenbestimmung liegenden Aktivitäten wurden durch Verlängerung der Geraden über den 100 % Wert hinaus bestimmt. Die Extrapolierbarkeit der Ergebnisse war bereits von Kokemohr (71) und von von Kries (80) nachgewiesen worden.

Die erhaltenen Werte sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. Die fehlenden Werte in einigen Tabellen entstanden dadurch, daß aufgrund vegetativer Dysregulationen einige Probanden kollabierten und eine Blutentnahme unmöglich wurde.

Tab. 4: Faktor VIII Gerinnungsaktivität der 6 Normalpersonen (%) unter i. v. Gabe von 0,5 µg/kg DDAVP.

Faktor VIII : c zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
1	152	192	462	360	244	225
2	78	80	93	152	100	78
3	70	196	275	294	290	--
4	80	455	792	360	256	304
5	105	210	300	498	500	348
6	200	515	728	548	364	164

Noch unter der Infusion mit DDAVP kommt es zum Aktivitätsanstieg von Faktor VIII. Dabei zeigen die 6 Probanden kein einheitliches Verhalten. Neben einer nur geringen Aktivitätszunahme bei einem Probanden (Tab. 4, Nr. 2) kommt es bei den anderen zu einer extremen Steigerung auf das fünf- bis achtfache des Ausgangswertes. Das Maximum der Aktivität mit Werten zwischen 93 und 792 % wird bei den einzelnen Personen zwischen Infusionsende und 120 Minuten nach Infusionsbeginn gemessen. Die Pro-

banden mit besonders starker Zunahme von VIII : c zeigen auch eine rasche Aktivitätsabnahme. 4 Stunden nach Infusionsbeginn liegt die Aktivität des Faktors VIII bei 3 Probanden noch deutlich über dem Ausgangswert.

Völlig anders ist das Bild für das Faktor VIII assozierte Antigen.

Tab. 5: Faktor VIII assoziiertes Antigen der 6 Normalpersonen (%) unter i. v. Gabe von 0,5 µg/kg DDAVP

	Faktor VIII : AG zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
1	184	200	264	286	340	358
2	96	98	122	150	164	170
3	48	70	106	116	134	--
4	96	100	164	286	320	348
5	104	134	180	210	238	270
6	182	240	280	310	300	304

Das Faktor VIII assoziierte Antigen zeigt einen sehr viel uniformeren und protrahierteren Anstieg bis auf maximal 310 %, während für die Gerinnungsaktivität Werte bis 700 und 800 % gemessen wurden. Bei 3 Probanden ist das Maximum, das deutlich unter den Höchstwerten für VIII : c liegt, 4 Stunden nach Infusionsbeginn noch nicht erreicht.

Tab. 6: PTT der 6 Normalpersonen (sec.) unter i. v. Gabe von 0,5 µg/kg DD

	PTT zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
1	34,8	33,6	28,1	28,7	30,5	31,7
2	43,1	42,9	41,6	41,3	41,6	42,6
3	42,0	34,1	32,1	31,5	32,0	--
4	44,0	33,1	29,4	36,1	38,2	35,2
5	43,2	37,2	32,7	28,1	27,7	31,5
6	36,7	28,1	25,7	32,4	33,0	39,0

Annähernd umgekehrt proportional zu der Faktor VIII Aktivität verhält sich die partielle Thromboplastinzeit. Der Proband mit der geringsten Aktivitätszunahme hatte auch nur eine geringe Verkürzung der PTT um 1 1/2 Sekunden. Das Maximum der Verkürzung beträgt bis zu 15,1 Sekunden und wird zu den Zeitpunkten erreicht, an denen die stärkste Aktivitätszunahme von VIII : c gefunden wurde. Nach 4 Stunden war eine deutliche Normalisierungstendenz erkennbar, die der Aktivitätsabnahme des Faktors VIII entspricht.

Tab. 7: Fibrinogengehalt der 6 Normalpersonen (mg/100ml) unter i. v. Gabe von 0,5 µg/kg DDAVP.

	Fibrinogen: zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
1	210	170	155	165	205	300
2	225	265	245	205	210	220
3	170	158	130	151	153	--
4	240	210	182	233	255	265
5	180	140	130	153	185	205
6	210	120	78	160	205	215

Das gerinnbare Fibrinogen nahm unter der Infusion bei den 5 Probanden mit starker Faktor VIII Aktivitätszunahme um 40 - 130 mg/dl und damit durchschnittlich um 65 mg/dl ab. Abweichend hiervon zeigte der 6. männliche Proband (Tab. 7, Nr. 2) mit nur geringer Faktor VIII : c Aktivitätszunahme zuerst einen leichten Ansteig mit anschließender Konzentrationsabnahme. Das Minimum für Fibrinogen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht und zwar 30 - 120 Min. nach Infusionsbeginn. Beim 4 Stundenwert wurden zum Teil höhere Fibrinogenspiegel gemessen als zu Versuchsbeginn.

4.2.1. Untersuchung der gesunden Normalperson im Doppelblindversuch.

Für eine Streßsituation ist ein überproportionaler Anstieg der Faktor VIII Gerinnungsaktiviät mehrfach beschrieben worden (51, 80, 137, 141). Um diese und ähnliche unspezifischen Effekte auszuschließen, die auf Grund der individuell sehr unterschiedlichen Reaktionen denkbar sind, wurde ein Doppelblindversuch durchgeführt.

In der gleichen Versuchsanordnung wie bei der vorangegangenen Pilotstudie wurde nach einem randomisierten Verfahren DDAVP bzw. Placebo bei zwei Gruppen von je 5 gesunden Normalpersonen infundiert. Das intravenös applizierte DDAVP bzw. Placebo wurde uns freundlicherweise von der Firma "Ferring Arzneimittel, Kiel", in gleicher Abfüllung und Verpackung zur Verfügung gestellt. Der infundierende Arzt wußte nicht, was er dem jeweiligen Probanden applizierte. Der Untersucher der Blutproben war nicht bei der Infusion anwesend, sondern erhielt die Untersuchungsproben ohne weitere Information jeweils nach Versuchsabschluß. Nach der Auswertung und Bestimmung der vier Parameter für die Versuchspersonen Nr. 7 - 16 und dem Vergleich mit der von der Firma "Ferring Arzneimittel, Kiel" zugesandten Auflistung in welcher Infusion sich DDAVP oder Placebo befand, ergaben sich folgende Faktor VIII Gerinnungsaktivitätswerte für die jeweiligen Versuchspersonen (Tab. 8).

Tab. 8: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5 µg/kg)unter Ermittlung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität (%).

	Faktor VIII : c zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	
7	128	137	156	156	154	Placebo
8	98	220	375	330	300	DDAVP
9	82	166	415	340	330	DDAVP
10	112	110	106	102	--	Placebo
11	83	81	80	83	82	Placebo
12	212	328	688	553	539	DDAVP
13	66	189	405	957	259	DDAVP
14	68	324	516	510	380	DDAVP
15	94	90	98	90	--	Placebo
16	58	55	58	56	52	Placebo

Faktor VIII : c wird wieder bei allen Probanden unter DDAVP auf das drei- bis neunfache des Ausgangswertes gesteigert mit einem Maximum zwischen dem Infusionsende und 60 Minuten nach Infusionsbeginn. Dagegen weisen die Normalpersonen mit Placebo nur minimale Veränderungen auf. Sowohl die Maximalwerte wie auch die Zeitpunkte der Maximalwerte sind different.

Die folgenden Ergebnisse des Faktor VIII : AG zeigen auch ein spezifisches Verhalten unter DDAVP i. v. Gabe.

Tab. 9: Doppelblindversuch mit DDAVP i.v. (0,5µg/kg) unter Ermittlung des Faktor VIII assoziierten Antigens (%).

	Faktor VIII : AG zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	
7	144	156	162	166	168	Placebo
8	84	126	192	300	360	DDAVP
9	76	132	186	236	268	DDAVP
10	98	97	94	97	--	Placebo
11	150	156	150	148	162	Placebo
12	116	194	250	340	480	DDAVP
13	68	82	154	340	350	DDAVP
14	78	160	216	270	240	DDAVP
15	93	87	86	90	--	Placebo
16	32	30	30	32	32	Placebo

Das Faktor VIII assoziierte Antigen bestätigt gleichfalls die Voruntersuchung. Es zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg, was bei der konstanten Dosis pro kg KG auf ein individuell unterschiedliches Ansprechen hindeutet. Innerhalb der 120 Min. Untersuchungszeitraum hat bei kontinuierlichem ständigen Anstieg nur eine der 5 Probanden den Gipfelwert erreicht, der bei allen deutlich unterhalb der maximalen Aktivität von VIII : c liegt. Die Normalpersonen weisen unter Placebogabe nur geringfügige Veränderungen des Antigens bei individuell unterschiedlichen Ausgangswerten auf. Proband Nr. 16 zeigt bereits im Ausgangswert einen deutlich erniedrigten Antigengehalt. Die Reaktion auf die Placebogabe spiegelt sich in der Konstanz der Meßwerte wieder. Der niedrige Ausgangswert läßt einen Probanden mit leichter Hämophilie A vermuten. Wegen Fehlens jeglicher Symptomatik wurde auf die weitere diagnostische Betrachtung dieses Falles verzichtet.

Tab. 10: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung der partiellen Thromboplastinzeit (sec.).

	PTT zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	
7	41,3	40,2	37,8	38,0	38,0	Placebo
8	42,9	37,4	33,1	34,6	34,3	DDAVP
9	42,4	36,9	32,1	32,6	33,2	DDAVP
10	40,8	40,9	41,4	41,5	--	Placebo
11	43,0	42,8	42,8	43,2	42,4	Placebo
12	33,5	31,7	28,5	31,9	31,7	DDAVP
13	44,4	37,3	31,1	23,4	33,0	DDAVP
14	46,2	32,2	30,3	30,3	32,3	DDAVP
15	40,9	40,6	31,8	40,3	--	Placebo
16	45,8	45,4	45,4	45,8	45,7	Placebo

Die PTT zeigt unter den Bedingungen des Doppelblindversuchs eine erhebliche Verkürzung nach Gabe von DDAVP um bis zu 21 sec., während in der Placebogruppe nur leichte, uneinheitliche Schwankungen auftreten.

Tab. 11: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5µg/kg) unter Ermittlung des Fibrinogens (mg/dl)

	Fibrinogen zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	
7	140	135	130	138	136	Placebo
8	145	140	120	128	130	DDAVP
9	265	235	200	222	231	DDAVP
10	220	215	210	217	--	Placebo
11	200	144	196	195	194	Placebo
12	130	132	125	136	140	DDAVP
13	170	150	138	135	184	DDAVP
14	155	152	136	120	145	DDAVP
15	230	224	236	230	--	Placebo
16	200	146	200	196	206	Placebo

Fibrinogen zeigt unter DDAVP wieder eine leichte Abnahme von durchschnittlich 50 mg/dl. Aber interessant ist auch die Placebogruppe, von denen drei eine leichte Abnahme des Fibrinogens um 20 mg/dl haben (Nr. 11, 15, 16). Hier sind unspezifische Effekte nicht auszuschließen.

4.2.2. Untersuchung der gesunden Normalpersonen bei nasaler Applikation von DDAVP.

Um die Resorbierbarkeit des DDAVP über die nasalen Schleimhäute zu testen erhielten 6 gesunde Probanden in Kopfseitenlage in jedes Nasenloch 50µg DDAVP gespritzt. Ein Problem bestand in der relativ großen Applikationsmenge an DDAVP. Einige Probanden bemerkten, daß bei etwas ungünstiger Lagerung des Kopfes DDAVP in den hinteren Rachenraum floß. Die Untersuchung der vier Gerinnungsparameter im Citratblut zu den festgesetzten Zeitpunkten ergaben die aus den folgenden Tabellen (Tab. 12 - 15) und Diagrammen ersichtlichen Werte.

Tab. 12: 100 µg DDAVP nasal bei Normalpersonen unter Ermittlung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität (%).

Faktor VIII : c zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
17	90	99	96	89	87	85
18	97	100	102	104	98	74
19	60	58	59	70	75	71
20	78	81	96	102	100	--
21	68	75	67	80	68	49
22	180	212	216	219	210	213

Die Faktor VIII Gerinnungsaktivität zeigte keine eindeutigen Veränderungen. Ein sicherer Aktivitätsanstieg wurde nur bei einem Probanden

gesehen (Tab. 12, Nr. 22). Zum 240 Minuten-Wert fand sich eine leichte Abnahme von Faktor VIII Gerinnungsaktivität bei 3 Probanden um 15 - 28 % gegenüber dem Höchstwert.

Tab. 13: 100 µg DDAVP nasal bei Normalpersonen unter Ermittlung des Faktor VIII assoziierten Antigens (%).

Faktor VIII : AG zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
17	102	100	101	98	98	105
18	98	94	94	95	98	96
19	96	91	95	91	96	101
20	56	53	54	55	56	--
21	100	96	95	100	101	99
22	181	184	186	184	186	195

Das assoziierte Antigen zeigt keine signifikanten Schwankungen.

Tab. 14: 100 µg DDAVP nasal bei Normalpersonen unter Ermittlung der partiellen Thromboplastinzeit (sec.).

PTT zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
17	43,0	43,8	43,4	42,6	42,0	41,4
18	41,1	41,9	34,0	38,9	40,8	42,0
19	48,1	49,6	47,0	46,4	47,2	48,1
20	39,4	39,8	39,8	39,2	37,8	--
21	47,2	49,7	45,7	46,8	46,2	48,0
22	36,1	35,4	31,5	31,4	33,1	34,7

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit läßt zum Teil nach kurzfristiger Verlängerung bei 3 Probanden eine eindeutige Zeitverkürzung bei allen um bis zu 5 sec. erkennen. Hierbei korreliert die PTT bedingt

in fast allen Punkten mit dem Anstieg des Faktor VIII : c.

Tab. 15: 100 µg DDAVP nasal bei Normalpersonen unter Ermittlung des Fibrinogens (mg/dl)

	Fibrinogen zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
17	208	205	200	202	200	203
18	195	185	187	190	210	225
19	218	195	167	163	150	155
20	240	230	175	250	258	--
21	140	108	115	113	118	122
22	195	190	225	225	195	193

Das Fibrinogen weist eine unterschiedlich ausgeprägte Abnahme auf. Die Konzentration nahm bei 3 der 6 Probanden um bis zu 65 mg/dl ab, während sie einmal geringfügig zunahm.

4.3 Untersuchung der Patienten mit Hämophilie A.

Es war ebenfalls von Interesse, wie die Patienten mit mittelschwerer Hämophilie A auf DDAVP reagierten. Zu diesem Zweck wurde 4 Patienten (Probanden Nr. 23 - 26) mit mittelschwerer Hämophilie A das Vasopressin Analogen DDAVP (Minirin ^{R}) über 30 Minuten in der Konzentration von 0,5 µg/kg infundiert und nach dem zuvor schon mehrmals beschriebenen Verfahren aus dem Citratblut zur jeweiligen Untersuchungszeit die vier in dieser Arbeit speziell untersuchten Gerinnungsparameter (Faktor VIII : c; VIII : AG; PTT; Fibrinogen) bestimmt. Ebenfalls ermutigten uns die zuvor gewonnenen Ergebnisse speziell die Stimulierung des Faktor VIII durch DDAVP 3 weiteren Patienten mit mittel-

schwerer Hämophilie A (Probanden Nr. 27 - 29) die übliche Dosis DDAVP als Prämedikation zur Zahnextraktion zu verabreichen. Sie erhielten in erprobter Weise 0,5 µg/kg über 30 Minuten infundiert und wurden sogleich zur Op in die Kieferklinik gebracht. Dort wurden weiter keine gerinnungsphysiologisch wirksamen Medikamente verabreicht und das Citratblut zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt auch dort entnommen.

Tab. 16: Einfluß von DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) auf Faktor VIII : c (%) bei Hämophilie A.

	Faktor VIII : c zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
23	5,6	6,4	7,1	8,5	21,0	7,0
24	3,6	3,5	4,2	8,4	4,1	--
25	4,0	4,2	5,3	4,0	3,6	--
26	2,6	2,5	3,4	2,8	2,7	2,7
27	5,0	10,5	25,0	17,0	12,0	8,5
28	7,5	13,0	19,0	15,0	11,5	8,5
29	3,3	4,6	5,6	4,8	4,2	4,0

Die Faktor VIII Gerinnungsaktivität zeigt bei mittelschwerer Hämophilie A einen eindeutigen Anstieg bis auf das 4- bis 5-fache des Ausgangswertes. Das Maximum lag individuell verschieden bei 30 - 120 min. nach Infusionsbeginn, wobei die Höhe des VIII : c Maximums mit der Höhe des Ausgangswertes direkt korrelierte. Bezeichnend ist, daß bei Ausgangswerten über 5 %, eine abnorm hohe in den Subnormalbereich fallende Faktor VIII Gerinnungsaktivität erreicht wurde. Bei den zur Zahnextraktion anstehenden Patienten Nr. 27 - 29 ist das Maximum 60 Minuten nach Infusionsbeginn bereits überschritten. Insgesamt läßt sich im Vergleich zu den 4 ersten Hämophilen aus Tab. 16 ein etwas schnellerer Reaktionsablauf feststellen, der auf den Op-Einfluß zurückzuführen ist.

Tab. 17: Einfluß von DDAVP i. v. (0,5 µg/kg auf Faktor VIII : AG (%) bei Hämophilie A.

	Faktor VIII : AG zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
23	280	300	370	660	880	890
24	210	240	280	480	580	--
25	128	170	260	280	350	--
26	230	260	450	490	615	700
27	140	164	256	274	312	312
28	132	128	160	286	256	300
29	200	220	260	270	320	360

Das Faktor VIII assoziierte Antigen steigt bei Ausgangswerten von 130 % - 280 %, die bei Hämophilie A Patienten gegenüber Normalpersonen meistens im oberen bzw. über dem Normalbereich sich befinden, auf das 2- bis 4-fache des Anfangswertes an. Ein Maximum konnte bei allen 4 Patienten selbst nach 240 min. noch nicht festgestellt werden. Selbst die drei zahnextrahierten Patienten (Probanden Nr. 27 - 29) zeigten keinerlei Auffälligkeiten.

Tab. 18: Einfluß von DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) auf das PTT (sec.) bei Hämophilie A.

	PTT zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
23	69,3	68,7	66,8	66,2	62,0	68,0
24	72,5	73,0	72,2	66,3	72,3	--
25	73,0	73,7	68,9	73,2	74,1	--
26	88,0	88,3	86,7	83,6	84,0	85,7
27	64,7	55,6	47,6	48,3	50,4	51,3
28	58,2	57,6	53,5	54,7	56,7	58,6
29	67,0	64,9	62,8	64,9	66,0	66,8

Die partielle Thromboplastinzeit nimmt unter der Belastung mit DDAVP um 4 - 17 sec. ab. Dabei ist die Abnahme zwischen 30 - 120 min. nach Infusionsbeginn der Konzentration an Faktor VIII : c umgekehrt proportional.

Tab. 19: Einfluß von DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) auf Fibrinogen (mg/dl) bei Hämophilie A

	Fibrinogen zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
23	115	108	103	107	130	135
24	242	215	215	245	245	---
25	190	182	160	165	200	---
26	210	188	205	215	220	235
27	178	160	152	175	184	190
28	235	220	245	250	260	270
29	240	200	235	245	250	275

Das Fibrinogen fällt zuerst um bis zu 40 mg/dl gegenüber den Ausgangswerten ab und stellt sich bei 240 min. nach Infusionsbeginn deutlich oberhalb der Anfangswerte ein. Eine Nachblutung nach Zahnextraktion trat nur bei dem dritten Probanden auf. Bei den beiden ersten heilte die Wunde komplikationslos ab.

4.4. Untersuchung der Gerinnungsparameter Faktor VIII : c; VIII : AG; PTT und Fibrinogen unter DDAVP Belastung bei sicheren, wahrscheinlichen und möglichen Konduktorinnen für Hämophilie A.

Ein großer Anteil der Konduktorinnen hat eine um 50 % gegenüber der Norm reduzierte Faktor VIII-Gerinnungsaktivität. Ebenso brachte die Entdeckung des Faktor- VIII- assoziierten Antigens auf immunologischem Wege zu

Gunsten einer differenzierten Diagnostik eine größere Aussagekraft und Treffsicherheit. Speziell der von Bennett (9) und Ratnoff (12) errechnete Quotient zwischen Faktor VIII Gerinnungsaktivität und der Antigenkonzentration (Ac / AG) erbrachte je nach Arbeitsgruppe bei 80 % - 95 % genetisch gesicherter Konduktorinnen die Diagnose. Diese falsch positive Differenz von 5 % - 20 % galt es im Sinne einer besseren Familienberatung durch definierte Belastung mit max. Stimulierung des Gerinnungssystems durch Gabe von DDAVP zu mindern.

Da die Kinetik von Faktor VIII : c und VIII : AG zuvor hinreichend untersucht ist, wurden zum Zweck einer differenzierteren Diagnostik 3 gesicherte, 6 wahrscheinliche und 6 mögliche Konduktorinnen der Belastung mit DDAVP (0,5 µg/kg) in Form einer Dauerinfusion über 30 Minuten ausgesetzt und die vier zuvor schon mehrfach an Normalpersonen untersuchten Gerinnungsparameter aus dem Citratblut zu den festgesetzten Zeitpunkten über 4 Std. bestimmt. Als gesichert gilt eine Konduktorin mit positiver Familienanamnese und mindestens einem hämophilen Sohn. Als wahrscheinlich gilt eine Konduktorin die einen hämophilen Sohn hat, aber keine positive Familienanamnese aufweist. Als möglich gilt eine Konduktorin, bei der nur eine positive Familienanamnese besteht. Hier wurden nur Schwestern von Hämophilen untersucht. Zuerst seien nun die Untersuchungsergebnisse der Gerinnungsparameter der gesicherten und wahrscheinlichen Konduktorinnen aufgeführt:

Tab. 20: DDAVP i. v. (0,5µg/kg unter Ermittlung des Faktor VIII : c (%) bei sicheren (Nr. 30 - 33) und wahrscheinlichen Konduktorinnen (Nr. 34 - 38) für Hämophilie A.

	Faktor VIII: c zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
30	63	82	122	118	93	92
31	30	52	64	77	60	34
32	52	58	137	129	117	--
33	40	51	54	56	51	44
34	60	102	320	312	116	78
35	35	68	85	110	66	36
36	81	142	161	168	129	108
37	32	62	118	125	78	39
38	70	80	118	140	132	130

Bei subnormalen Ausgangswerten von 25 % bis 80 % kam es bereits unter der Infusion mit DDAVP zum Aktivitätsanstieg von Faktor VIII : c. Das Maximum stellte sich 30 - 120 min. nach Infusionsbeginn ein. Bei den 4 gesicherten und 5 wahrscheinlichen Konduktorinnen zeigte die Aktivitätszunahme eine relativ einheitliche Tendenz. Nur eine Probandin (Nr. 34), die vom Ausgangswert gesehen nach herkömmlicher Diagnostik ebenfalls als wahrscheinliche Konduktorin eingestuft wurde, zeigte einen herausragenden für Konduktorinnen atypischen, starken Anstieg und Abfall mit einem Maximum von 320 %. Dieser Probandin galt besondere Aufmerksamkeit.

Das Faktor VIII assoz. Ag. erbrachte folgende Untersuchungsergebnisse:

Tab. 21: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung des Faktor VIII : AG (%) bei sicheren (Nr. 30 - 33) und wahrscheinlichen Konduktorinnen (Nr. 34 - 38) für Hämophilie A.

	Faktor VIII - AG zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
30	88	110	138	136	142	138
31	120	170	210	240	264	304
32	148	160	184	300	304	--
33	116	140	172	176	180	176
34	161	205	230	234	260	330
35	120	164	196	212	210	224
36	138	192	216	234	238	238
37	188	230	256	304	352	376
38	52	56	88	96	102	112

Beim Faktor VIII assoz. Antigen wurde über den Zeitraum von 4 Std. unter DDAVP eine bis zum zweieinhalbfachen verstärkte Konzentration nachgewiesen. Dieser Verlauf mit einem individuell unterschiedlichen uniform langsamen Anstieg auf maximal 380% zeigte keinen Unterschied zwischen sicheren und wahrscheinlichen Konduktorinnen im Vergleich zu Normalpersonen. Das Maximum war bei allen 8 Probandinnen nach 4 Std. noch nicht erreicht. Es hat sich gezeigt, daß die Ratio als Quotient aus Faktor VIII Gerinnungsaktivität und Faktor VIII assoziiertem Antigen für die Diagnostik von besonderer Bedeutung ist.

Tab. 22: DDAVP i. v. (0,5µg/kg) unter Ermittlung des Faktor VIII R (Ac/AG) bei sicheren (Nr. 30 - 33) und wahrscheinlichen Konduktorinnen (Nr. 34 - 38) für Hämophilie A.

	Faktor VIII : R (Ac/AG) zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
30	0,71	0,74	0,87	0,86	0,65	0,66
31	0,25	0,31	0,31	0,32	0,23	0,11
32	0,35	0,37	0,74	0,43	0,38	--
33	0,34	0,36	0,32	0,32	0,28	0,25
34	0,37	0,50	1,39	1,33	0,45	0,24
35	0,29	0,41	0,43	0,52	0,31	0,16
36	0,59	0,74	0,75	0,72	0,54	0,45
37	0,17	0,27	0,46	0,41	0,22	0,10
38	1,35	1,43	1,45	1,27	1,29	1,17

Trotz Stimulation mit DDAVP überschritt die Ratio bei den 3 gesicherten und 3 wahrscheinlichen Konduktorinnen (Nr. 31, 32, 33, 35, 36, 37) bei nahezu einheitlicher Tendenz den Wert 0,8 nicht. Nur die schon zuvor aufgefallene Probandin (Nr. 34) wies wiederum weit im Normalbereich befindliche Werte für die Ratio auf, obwohl der Ausgangswert sie als Konduktorin darstellte. Die Probandin Nr. 38 unterschied sich von allen anderen Konduktorinnen durch ihre bereits weit im Normalbereich liegenden Ausgangs- und Stimulationswerte für die Faktor VIII Ratio, obwohl VIII : c und VIII AG die für Konduktorinnen typischen subnormalen Werte aufwiesen.

Die Probandin Nr. 30 zeigte eine geringfügige Erhöhung über den Grenzwert, der sich trotz leicht differierender Meinungen bei 0,8 festlegen lässt. Die außerordentlich schlechte Stimulierbarkeit rechtfertigt, diese Patientin ebenfalls zu den Konduktorinnen zu zählen.

Tab. 23: DDAVP i. v. (0,5µg/kg) unter Ermittlung der partiellen Thromboplastinzeit (sec.) bei sicheren (Nr. 30 - 33) und wahrscheinlichen Konduktorinnen (Nr. 34 - 38) für Hämophilie A.

	PTT zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
30	47,3	43,5	41,0	42,0	42,5	42,5
31	44,3	40,5	38,1	36,0	34,8	38,0
32	44,0	43,2	37,1	37,1	38,2	--
33	39,1	36,6	35,6	35,2	37,9	38,1
34	37,2	33,3	26,1	27,1	32,5	35,0
35	42,4	36,0	33,6	33,2	35,8	39,3
36	35,0	31,2	29,3	28,6	30,4	31,6
37	44,2	39,4	33,2	33,6	34,5	38,8
38	42,75	41,0	40,0	39,5	37,0	38,5

Proportional zur Faktor VIII Aktivität verhielt sich die partielle Thromboplastinzeit. Die Verkürzung der PTT betrug im Maximum zwischen 5 und 11 sec. Hierbei trat mit extremer Verkürzung der PTT die wahrscheinliche Konduktorin (Tab. 23, Nr. 34) hervor. Die PTT Werte der ebenfalls zuvor auffälligen Konduktorin (Tab. 23, Nr. 38) entsprachen, obwohl sie den Konduktorinnen entsprechend im subnormalen Bereich lag, der Kinetik der dazugehörigen Faktor VIII : c Werte. Nach 4 Stunden war eine deutliche Normalisierungstendenz erkennbar, die der Aktivitätsabnahme der Faktor VIII Gerinnungsaktivität entsprach.

Tab.: 24 DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung des Fibrinogens (mg/dl) bei sicheren (Nr. 30 - 33) und wahrscheinlichen Konduktorinnen (Nr. 34 - 38) für Hämophilie A.

	Fibrinogen zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
30	155	142	135	145	155	160
31	290	270	250	260	310	300
32	230	210	208	250	250	--
33	186	180	170	163	172	200
34	220	195	180	182	228	245
35	220	208	205	230	240	250
36	325	300	280	315	370	415
37	220	204	220	230	245	260
38	173	135	120	110	150	175

Der Fibrinogengehalt nahm unter der Infusion bei allen 9 Konduktorinnen relativ einheitlich um 15 - 63 mg/dl ab. Das Maximum wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht und zwar 15 - 120 min. nach Infusionsbeginn. Der 4 Stundenwert zeigte einheitlich höhere Fibrinogenspiegel als zu Versuchsbeginn.

Es seien hier nun die Ergebnisse der vier Gerinnungsparameter VIII : c, VIII : AG, PTT und Fibrinogen bei 6 möglichen Konduktorinnen d.h. Konduktorinnen für Hämophilie A mit nur familiärer Belastung aufgezeigt und beschrieben. Es fanden nur Schwestern hämophiler Patienten Eingang in die Studie. Sie befanden sich im Alter von 16 - 25 Jahren und hatten noch keine Kinder.

Tab. 25: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität (%) bei möglichen Konduktorinnen für Hämophilie A.

Faktor VIII : c zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
39	54	118	154	160	104	122
40	32	34	38	46	33	33
41	72	114	128	150	104	77
42	82	125	129	162	153	138
43	200	240	300	400	300	160
44	82	126	172	240	116	79

5 Probandinnen wiesen bereits zu Versuchsbeginn eine Faktor VIII Gerinnungsaktivität im unteren Normbereich auf. Davon entwickelte eine Patientien (Nr. 44), für Konduktorinnen überdurchschnittlich hohe Faktor VIII Gerinnungsaktivitätswerte bis 240 %. Die 6. mögliche Konduktorin (Nr. 43) fiel bereits zu Anfang durch einen Faktor VIII : c Wert von 200 % auf, der sich unter DDAVP auf 400 % steigerte. Diese beiden zuletzt erwähnten Konduktorinnen finden später besondere Beachtung. Probandin Nr. 40 war zu Versuchsbeginn subnormal und blieb es auch trotz Stimulation.

Tab. 26: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung des Faktor VIII assoziierten Antigens (%) bei möglichen Konduktorinnen für Hämophilie A.

Faktor VIII : AG zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
39	72	108	150	154	192	194
40	108	176	190	202	216	236
41	136	150	204	210	240	246
42	108	136	190	210	236	244
43	150	180	188	198	196	210
44	90	136	156	176	182	182

Das Faktor VIII assoziierte Antigen wies bei allen 6 möglichen Konduktorinnen mit Ausgangswerten zwischen 90 und 150 % eine normale Konzentrationszunahme mit uniform langsamem Anstieg um das doppelte des Ausgangswertes auf maximal 245 % auf. Das Maximum war nach 4 Std. Untersuchungszeit noch nicht erreicht.

Tab. 27: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung der Faktor VIII Ratio (Ac/AG) bei möglichen Konduktorinnen für Hämophilie A.

	Faktor VIII : R (Ac/AG) zum Untersuchungszeitpunkt					
Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
39	0,75	1,04	1,03	1,03	0,54	0,62
40	0,30	0,19	0,20	0,23	0,15	0,14
41	0,53	0,76	0,63	0,71	0,43	0,31
42	0,75	0,92	0,68	0,77	0,65	0,57
43	1,33	1,33	1,60	2,02	1,53	0,76
44	0,91	0,93	1,10	1,36	0,64	0,43

Die Faktor VIII Ratio weckt durch seine stark divergierenden Werte besonderes Interesse. 2 der 6 möglichen Konduktorinnen steigen trotz Stimulation mit DDAVP nicht über 0,8. Die Probandinnen Tab. 27, Nr. 39 und 42, die anfangs eine Ratio im Grenzbereich aufwiesen, reagieren selbst unter maximaler Stimulation nur sehr schwach bis auf Werte um 1,0. Die beiden möglichen Konduktorinnen Tab. 27, Nr. 43 und 44 fielen bereits durch ihre Anfangswerte auf, die um bzw. über 1,0 lagen und auf die Stimulation sehr stark mit maximalen Werten von 1,36 bzw. 2,02 reagieren.

Tab. 28: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung der partiellen Thromboplastinzeit (sec.) bei möglichen Konduktorinnen für Hämophilie A.

PTT zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
39	43,5	39,3	36,3	37,0	38,0	37,6
40	44,0	38,5	37,4	37,0	38,8	38,9
41	38,1	34,5	34,2	33,6	35,4	37,2
42	40,2	34,7	33,0	32,7	28,5	30,5
43	35,3	32,2	31,0	30,0	31,2	31,9
44	35,7	30,5	28,6	24,8	32,4	35,8

Die partielle Thromboplastinzeit verhielt sich, wie zu erwarten, umgekehrt proportional der Faktor VIII Gerinnungsaktivität. Die Verkürzung der PTT hatte ihr Maximum mit 6 - 11,5 sec. zwischen den Zeitpunkten 60 und 120 min. nach Infusionsbeginn. Hierbei erwiesen sich die Absolutwerte der Probandinnen Tab. 28, Nr. 43 und 44 als relativ niedrig gegenüber den anderen möglichen Konduktorinnen. Bei der starken Schwankungsbreite der Werte zeigten sich jedoch nach 4 Stunden eindeutige Normalisierungstendenzen.

Tab. 29: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) unter Ermittlung des Fibrinogens (mg/dl) bei möglichen Konduktorinnen.

Fibrinogen zum Untersuchungszeitpunkt

Nr.	0'	15'	30'	60'	120'	240'
39	184	175	167	180	215	215
40	190	170	180	186	190	205
41	230	225	220	230	270	290
42	250	210	230	228	234	250
43	180	175	174	177	182	208
44	190	165	150	147	170	182

Der Fibrinogenspiegel zeigt wie zuvor schon mehrfach erwähnt auch bei den möglichen Konduktorinnen unter der Belastung mit DDAVP eine Abnahme zwischen den Zeitpunkten 15 und 60 min. um 6 - 43 mg/dl, während die 4 Stundenwerte bei vier Probandinnen über den Ausgangswerten lagen.

4.5. Untersuchung des methodischen Fehlers für die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität des Faktor VIII assoziierten Antigens, der PTT und des Fibrinogens.

Der methodische Fehler ist eine statistische Qualitätskontrolle der Analysenergebnisse. Zur Fehlerberechnung muß die Streuung der Analysenergebnisse durch Mehrfachbestimmung innerhalb der gleichen Serie ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden von drei Normalpersonen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen (Gesetz der Serie) die vier Gerinnungsparameter im Plasma mehrfach bestimmt und für jede Person der Tagesmittelwert errechnet. Die Personen hatten unterschiedliche Gerinnungsaktivitätswerte im Plasma. Der methodische Fehler wird für jede Person getrennt durch die Ermittlung der Streubreite und Bestimmung der Standardabweichung ausgedrückt. Die Entstehung des methodischen Fehlers ist darauf zurückzuführen, daß eine Reihe von Bedingungen, die einen Einfluß auf das Analysenergebnis haben, sich von Tag zu Tag ändern können (z.B. unterschiedliche Witterungsverhältnisse und Raumtemperatur, neu angesetzte Reagenzien, Wechsel von Meßgeräten, unterschiedliche Auftau- und Gefrierzeiten, sowie Gefriertemperaturen. Die entsprechenden Werte sind den folgenden Tabellen zu entnehmen, wobei sie wiederum Mittelwerte aus einer vierfach -Bestimmung der Aktivitäten eines jeden Tages sind.

Tab. 30: Methodischer Fehler für die Gerinnungsparameter Faktor VIII c, Faktor VIII AG, PTT und Fibrinogen bei 3 Probanden (Nr. 45 - 47) über 5 aufeinanderfolgende Tage.

Proband Nr. 45

Datum	VIII:c %	VIII:AG %	aPTT sec.	Fibrinogen mg/dl
22.6.	165	154	36,2	337
23.6.	170	150	36,1	340
24.6.	152	142	36,2	338
25.6.	160	156	36,2	342
26.6.	163	142	36,2	341
Mittelwert	162	147	36,2	340
Streubreite	152-170	142-165	36,1-36,2	337-342
Standardabweichung	± 6	± 7	± 0,1	± 2

Proband Nr. 46

Datum	VIII:c %	VIII:AG %	aPTT: sec.	Fibrinogen mg/dl
22.6.	100	130	39,6	230
23.6.	107	121	39,5	233
24.6.	93	145	39,6	230
25.6.	95	132	39,5	233
26.6.	95	138	39,5	232
Mittel-wert	98	133	39,5	232
Streu-breite	93-107	121-145	39,5-39,6	230-233
Standard-abweichung	± 6	± 9	± 0,1	± 2

Proband Nr. 47

Datum	VIII:c %	VIII:AG %	aPTT: sec.	Fibrinogen mg/dl
22.6.	122	152	37,6	261
23.6.	118	142	36,3	258
24.6.	130	158	37,5	261
25.6.	130	140	37,5	261
26.6.	126	148	37,6	257
Mittel-wert	125	148	37,3	260
Streu-breite	118-130	140-158	36,3-37,6	257-261
Standard-abweichung	± 5	± 5	± 0,1	± 2

4.5.1. Untersuchung des systematischen Fehlers für die Bestimmung der Faktor VIII Gerinnungsaktivität, des Faktor VIII assoz. Antigens, der PTT und des Fibrinogens

Systematische Fehler treten bei der Durchführung von Analyseverfahren auf, wenn falsch eingestellte Volumenmeßgeräte verwendet werden z.B. Pipetten, Meßbecher, Dispensoren, wenn nicht bei der vorgeschriebenen Temperatur inkubiert, gemessen bzw. die Kühltemperatur nicht erreicht wird, wenn die Pufferlösung nicht auf den vorgeschriebenen ph - Wert gebracht, wenn nicht ausreichend reine Reagenzien verwendet werden, wenn die zu analysierende Substanz für eine Standardlösung falsch eingewogen wird, wenn die zur Inkubation vorgeschriebenen Zeiten nicht exakt eingehalten werden oder Standardreagenzien und Seren überaltert bzw. damit ihren vorgeschriebenen Faktorengehalt nicht erreichen.

Um den systematischen Fehler zu ermitteln, werden von einer Normalperson 10 mal die betreffenden vier Gerinnungsparameter bestimmt. Dabei entstammten die untersuchten Plasmen einer Citratblutentnahme. Zur Quantifizierung des Fehlers wurden der Mittelwert und die Streubreite bestimmt. Im Anschluß ließ sich die einfache Standardabweichung nach der Formel $s = \pm \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$ ermitteln.

Tab. 31: Systematischer Fehler für die Gerinnungsparameter Faktor VIIIc, Faktor VIII AG, PTT und Fibrinogen bei zehnfacher Bestimmung.

	VIIIc: %	VIII AG: %	aPTT: sec.	Fibrinogen mg/dl
	108	108	39,5	232
	99	104	39,5	225
zehn-	99	108	39,6	225
fach	109	106	39,7	239
Be-	110	100	39,4	232
stim-	105	108	39,5	232
mung	107	102	39,6	232
	102	100	39,5	232
	103	102	39,5	239
	106	110	39,5	232
Mittel-wert	105	105	39,5	232
Streu-breite	99-110	100-110	39,5-39,7	225-239
Standard-abweichung	± 4	± 3	± 0,1	± 5

Aus den Messungen geht hervor, daß der systematische Fehler eine geringere Standardabweichung aufweist als der methodische Fehler. Dies ist der Fall, da der systematische Fehler mit in den methodischen Fehler Eingang findet. Außerdem kann der methodische Fehler bei den drei verschiedenen Probanden nicht einheitlich sein, da die Standardabweichung mittelwertbezogen ist. Die niedrigen Standardabweichungen zeigen jedoch, daß die Fehlerquellen in den Untersuchungsmethoden gering genug gehalten worden sind. Es ist ein Ausdruck der Qualität der Methode und ihrer Durchführung.

5. Diskussion:

5.1. DDAVP i.v. bei Normalpersonen.

In der Literatur ist mehrfach die weite Spanne der individuellen physiologischen Schwankungsbreite für die Faktor - VIII - Gerinnungsaktivität, für die Antigenkonzentration, die partielle Thromboplastinzeit und den Fibrinogengehalt bei Normalpersonen (158, 57, 68, 75, 111) beschrieben worden. Ebenfalls bedingt durch die außerordentlich breite individuelle Streuung in Abhängigkeit von den verschiedensten Zuständen des Gesamtorganismus, die physiologischer oder pathologischer Natur sein können (3, 8, 34, 45, 120), zeigten auch die von uns durchgeführten Bestimmungen der Faktor - VIII - Gerinnungsaktivität, der Antigenkonzentration, der partiellen Thromboplastinzeit und des Fibrinogengehaltes unter i.v. Gabe von 0,5µg/kg DDAVP bei Normalpersonen ein breites und individuell gefärbtes Spektrum. Dies ist aus den folgenden vier Diagrammen sehr deutlich zu entnehmen, die die Zahlen der Tab. 4 - 7 enthalten.

DDAVP i.v. (0,5µg/kg) und VIII:c bei Normalpersonen

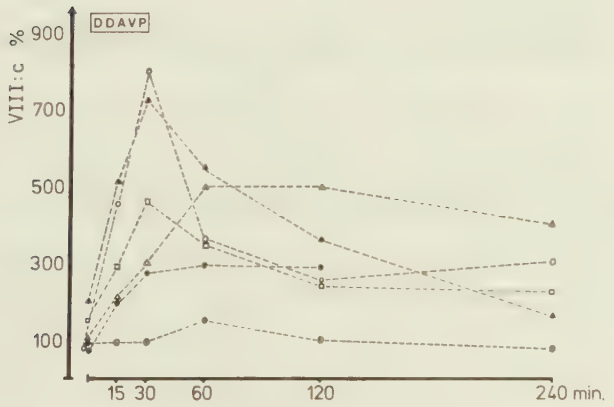

Abb.5: DDAVP i.v. (0,5µg/kg) und VIII:c bei Normalpersonen

Die breite Streuung bei unterschiedlichen Ausgangswerten, vor allem nach DDAVP Gabe spiegelt sich in den Diagrammen als individuell geprägte Reaktion eines jeden Organismus auf das Vasopressin - Analogon in Faktor VIII:c (Abb. 5) wieder. Dabei nimmt VIII:c sehr rasch und überproportional stark zu im Vergleich zu VIII:AG. Es ist in der Regel eine Steigerung der Aktivität um das 2 - 3 fache des Ausgangswertes zu erwarten. Bezeichnend ist jedoch, daß VIII:c während des Untersuchungszeitraumes ein Maximum erfährt und nahezu immer zum Ausgangswert zurückkehrt.

DDAVP i.v. (0,5µg/kg) und VIII:AG bei Normalpersonen

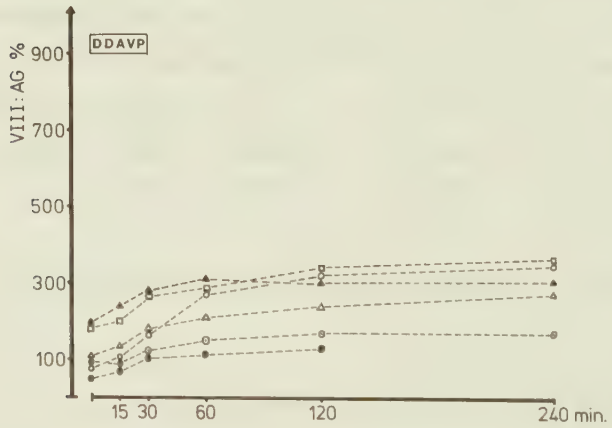

Abb. 6: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und VIII:AG bei Normalpersonen

Im Gegensatz dazu ist für VIII:AG (Abb. 6) ein uniform langsamer und gleichmäßiger Anstieg über den gesamten Untersuchungszeitraum zu erfahren. Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, daß Faktor VIII:AG nicht nur vermehrt freigesetzt wird, sondern auch eine zusätzliche Aktivierung erfährt.

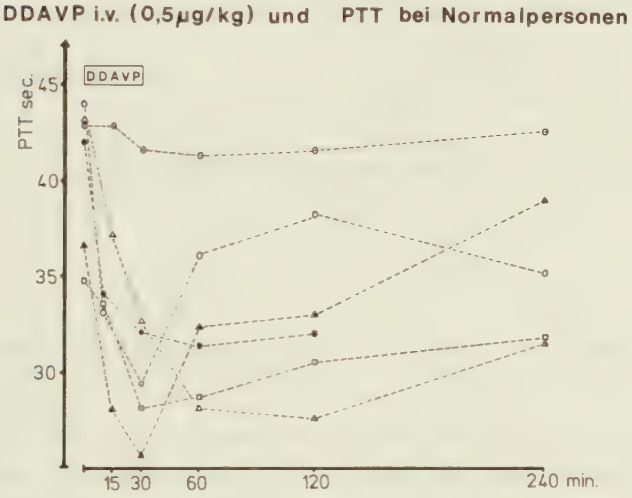

Abb. 7: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und PTT bei Normalpersonen.

Annähernd umgekehrt proportional zu der Faktor VIII - Aktivität verhält sich die partielle Thromboplastinzeit (Abb. 7), obwohl aus der Verkürzung der Zeit keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Faktor VIII - Aktivitätszunahme abgeleitet werden können. Bezeichnend ist auch, daß annähernd alle Probanden nach Abschluß des Untersuchungszeitraumes zum Ausgangswert zurückkehren.

DDAVP i.v. (0,5µg/kg) und FIBRINOGEN bei Normalpersonen

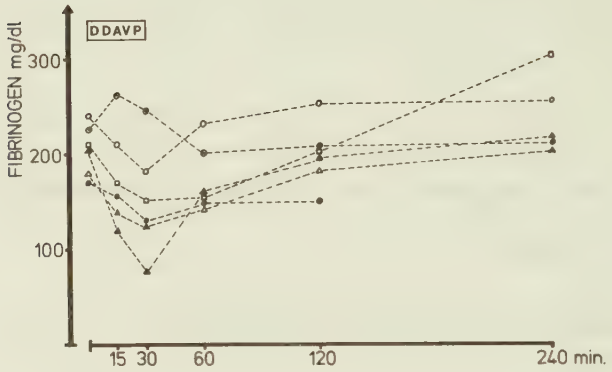

Abb. 8: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und Fibrinogen bei Normalpersonen

Abb. 8 verdeutlicht die passagere Erniedrigung des Fibrinogengehaltes um durchschnittlich 35 mg/dl bzw. 10 % des Ausgangswertes und den häufigen reaktiven Anstieg zu Ende des Untersuchungszeitraumes. Dies läßt die Vermutung aufkommen, daß es unter DDAVP zu einer kurzzeitigen Fibrinolyse oder Proteolyse mit reaktiver Freisetzung kommt, deren genaue Mechanismen jedoch ausführlicher Untersuchungen bedürfen.

5.1.1 Doppelblindversuch mit DDAVP bei Normalpersonen.

Die Pilotstudie konnte trotz eindeutigem Verhalten der Gerinnungsparameter der Probanden eine Interferenz mit einer Stressreaktion nicht ausschließen, da für diese in früheren Untersuchungen (47, 79, 80) ein über-

proportionaler Anstieg der Faktor VIII Gerinnungsaktivität mehrfach beschrieben wurde. Zum Ausschluß dieser Reaktion wurde nach randomisierten Verfahren ein Doppelblindversuch durchgeführt. Die Meßwerte dieser Untersuchung (Tab. 8 - 11) sind in den Diagrammen (Abb. 9 - 12) dargestellt.

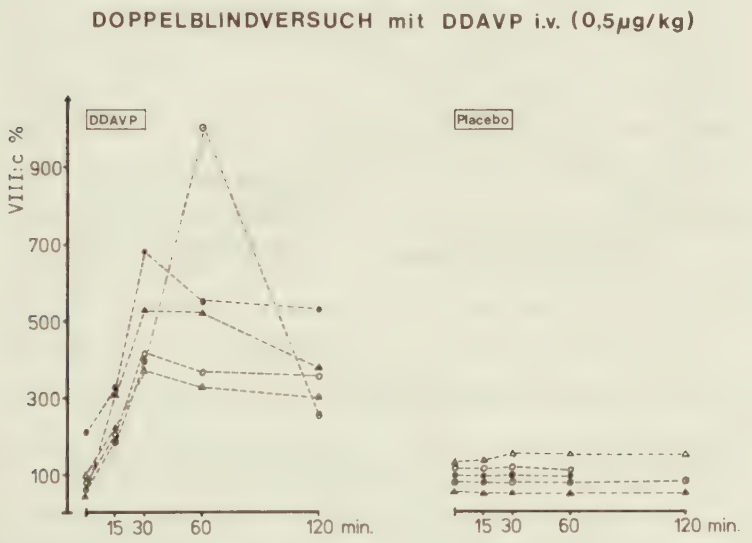

Abb. 9: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5 µg/kg KG) und VIII:c

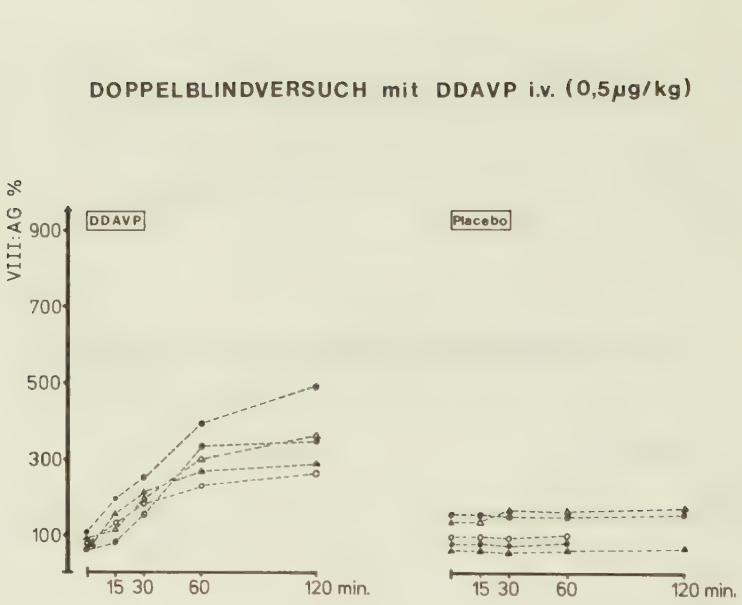

Abb. 10: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und VIII:AG

Dabei zeigten die Probanden mit DDAVP-Gabe ein identisches Verhalten (Abb. 5 - 8), wie in der Pilotstudie. Die Konstanz der Meßergebnisse für die vier Gerinnungsparameter bestätigen den geringen methodischen Fehler. Durch den Doppelblindversuch wurde somit die oben beschriebene unspezifische Reaktion ausgeschlossen und die von (Blätter, Goebel, Scharrer, Vilhardt, Körninger, Brunswig, Köstering, Pindur, Bartels, Schimpf, Niessner Seiler und vor allem Mannucci) beobachtete Reaktion auf DDAVP bestätigt. Nur das Fibrinogen (Abb. 12) zeigt im Placeboversuch unter Kochsalzinfusion einen passageren Abfall, der aber geringer als in der DDAVP-Gruppe ausfällt. In der vorliegenden Untersuchung wurde DDAVP höher

dosiert als in früheren Untersuchungen. Die Reaktion besteht in einer vermehrten Freisetzung von Faktor VIII und einer zusätzlichen Aktivierung. Ein vergleichbarer Effekt wurde von Mannucci et al. während einer 6 - stündigen Infusion von 1,4 µg/kg Lysin - Vasopressin (n = 4) und Prowse et al (112) nach 30 - minütiger Infusion von 20 µg/DDAVP (n = 2) beobachtet.

Bei der Aktivierung von VIII:c ist die wiederholt beschriebene Freisetzung von Plasminogen Aktivator bei Gabe von DDAVP wahrscheinlich bedeutungsvoll (Cash et al. (27, 28), Gader et al. (46), Mannucci et al. 1975 (89). So beschrieben schon 1969 Niemitz und Nossel (98) eine Erhöhung von VIII:c im Einphasentest bei fibrinolytischen Zuständen. Pasquini und Hershgold (1973) (104) sahen bei in vitro Untersuchungen eine Aktivitätszunahme von VIII:c, wenn durch Plasmin gespaltene Faktor VIII - Bruchstücke zu Normalplasma gegeben wurden. Da die überproportionale VIII:c Steigerung mit der früher beschriebenen Freisetzung von Plasmin - Aktivator zeitlich übereinstimmt, spricht dies für einen derartigen Zusammenhang. Klarheit darüber erbringen wahrscheinlich die sich in anderen Laboratorien in Untersuchung befindenden Plasmen, bei denen vor Gabe von DDAVP Antifibrinolytika verschiedenster Art gegeben wurden.

Von Voss (140) gab eine weitere Erklärungsmöglichkeit. Er stellte fest, daß durch Gabe von DDAVP die Thrombozyten zur vermehrten Produktion von Malonylaldehyd stimuliert wurden. Es war bereits zuvor von ihm über den Zusammenhang zwischen Plättchenfaktor 3, Malonylaldehyd - Produktion durch die Thrombozyten und Faktor VIII:c berichtet worden (141).

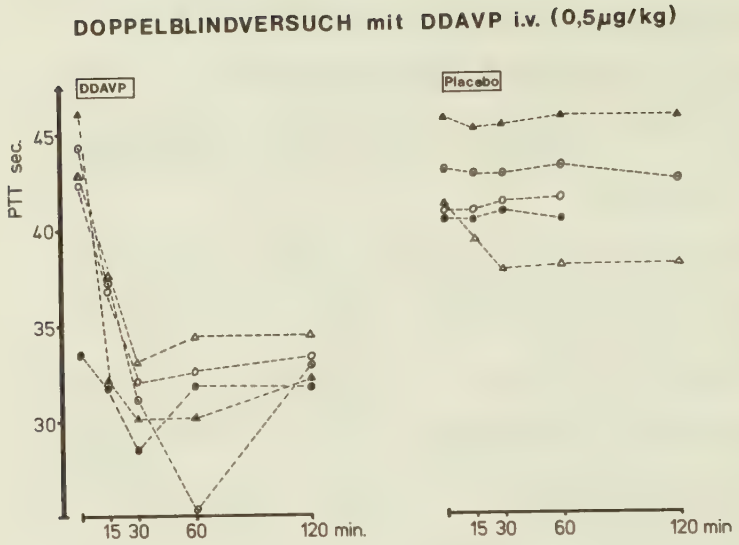

Abb. 11: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und PTT.

Die partielle Thromboplastinzeit (Abb. 11) korreliert in beiden Untersuchungsreihen mit der Aktivitätszunahme im Faktor VIII. Diese Ergebnisse sind mit den Beobachtungen von Köstering, Mingers, Seiler, Korninger und Scharrer identisch.

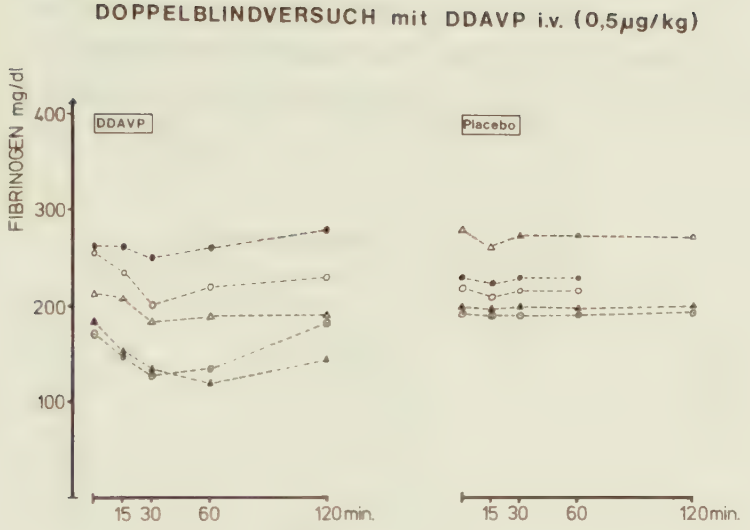

Abb. 12: Doppelblindversuch mit DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und Fibrinogen

Das Verhalten des Fibrinogengehaltes (Abb. 12) unter DDAVP in obigen Untersuchungen kann von anderen Autoren nicht in dieser deutlichen Form bestätigt werden. Korninger und Köstering stellten lediglich vereinzelt eine geringfügige passagere Erniedrigung des Fibrinogen fest, dem sie jedoch keine Bedeutung beimaßen. Diese Diskrepans läßt sich durch die wesentlich geringeren Dosen DDAVP, die Korninger, (0,3 µg/kg) und Köstering, (0,2 µg/kg) gegenüber der hier verwandten Dosis von 0,5 µg/kg erklären. Die Bedeutung einer Fibrinolyse oder Proteolyse in Zusammenwirken mit einer flüssigkeitsretentionsbedingten Hämodilution unter DDAVP stimmt mit den Untersuchungen von Seiler (126) überein. Er stellte eine Abnahme des Plasmaproteins fest, die sogar über die nachgewiesene flüssigkeitsretentionsbedingte Hämodilution hinausgeht.

5.1.2 DDAVP nasal appliziert bei Normalpersonen.

Genau wie von anderen Autoren bestätigt (Sutor (136), Theiss (137) bereitet die intranasale Gabe von DDAVP erhebliche Schwierigkeiten. Eine intranasale Gabe von 100 µg DDAVP entspricht einer Resorptionsmenge von 1 ml und bereitet erhebliche Resorptionsschwierigkeiten.

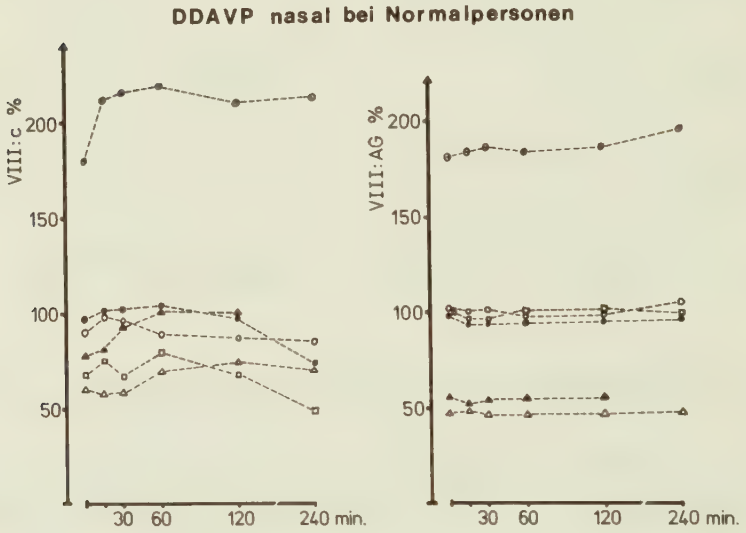

Abb. 13: DDAVP nasal (0,5 µg/kg) und VIII:c bei Normalpersonen

Abb. 14: DDAVP nasal (0,5 µg/kg) und VIII AG bei Normalpersonen

Die Untersuchungen ergeben, daß eine Zunahme von VIII:AG ausbleibt (Abb. 14). Trotzdem nimmt VIII:c leicht zu (Abb. 13), während die PTT leicht verkürzt wird (Abb. 15). Dies entspricht der zuvor geäußerten

Annahme der Aktivierung von VIII:c und bestätigt den unspezifischen Effekt des DDAVP auf VIII:c, der durch die gesteigerte Fibrinolyse erklärt werden kann. Der Faktor VIII:c Aktivierung entspricht die Verkürzung der PTT. Die Verbesserung der Haemostase, welche sich aus Messungen der Blutungszeit nach Sutor ergeben, sprechen für eine gleichzeitige Beeinflußung der Thrombozyten.

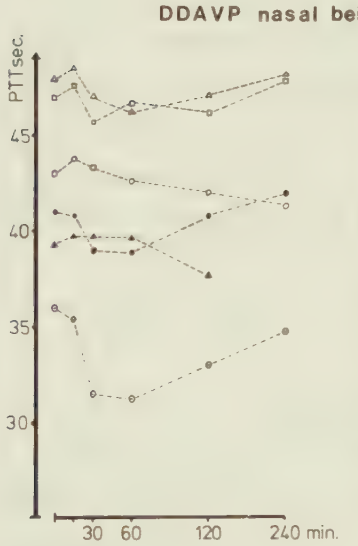

Abb. 15: DDAVP nasal (0,5 µg/kg) und PTT bei Normalpersonen

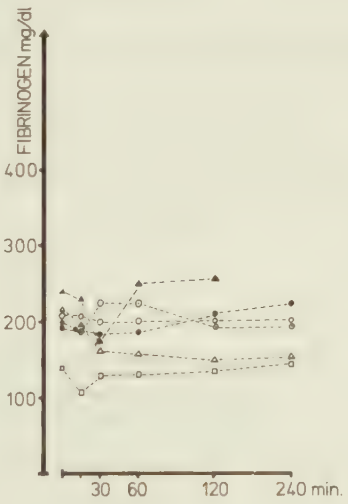

Abb. 16: DDAVP nasal (0,5 µg/kg) und Fibrinogen bei Normalpersonen

Das Fibrinogen(Abb. 16) zeigt ein der Placebogruppe etwa entsprechendes Verhalten mit nur leichtem passagerem Abfall, wobei die Placebogruppe eine unspezifische Reaktion zeigt. Dies ist auch hier durch Streß induzierte

flüssigkeitsretentionsbedingte Hämodilution und den physiologischen Verdünnungseffekt der Na Cl Infusion zu erklären.

Eine bessere Wirksamkeit des DDAVP erreichte DONOVAN, der mit einer höher konzentrierten DDAVP - Lösung (113 µg/0,1 ml) arbeitete. Er machte sich hierbei die Untersuchungen von CHAPLAIN zu Nutze, der die Ansicht vertrat, daß nicht mehr als 0,2 ml Flüssigkeit in der Nase resorbiert werden kann. Die gewonnenen Ergebnisse geben jedoch Anlaß, den haemostatischen Effekt des nasal applizierten DDAVP auszunutzen speziell als Behandlungsalternative für eine frühzeitige unproblematische Erstversorgung einer hämophilen Blutung. Es muß jedoch die schlechte Steuerbarkeit bzw. ein Versagen der Therapie berücksichtigt werden, wenn die Patienten unter Schnupfen oder Nasenbluten leiden, bzw. Kleinkinder sind. DDAVP zeigt nasal seine größte Wirksamkeit, wenn man es hochkonzentriert in 4 - facher Dosis /kg gegenüber i.v. - Gabe appliziert (122, 123, 136, 137).

5.2. DDAVP bei Patienten mit Hämophilie A

Die in der Literatur mehrfach beschriebene Diskrepanz für Faktor - VIII Gerinnungsaktivität und Antigenkonzentration bei Patienten mit Hämophilie A (stark erniedrigter bis fast völlig fehlender Gerinnungsaktivitätsspiegel im Plasma bei normaler bis erhöhter Antigenaktivität) (4, 9, 24, 53, 63, 69, 76, 83, 96, 123) kann auch in unseren Untersuchungen bestätigt werden.

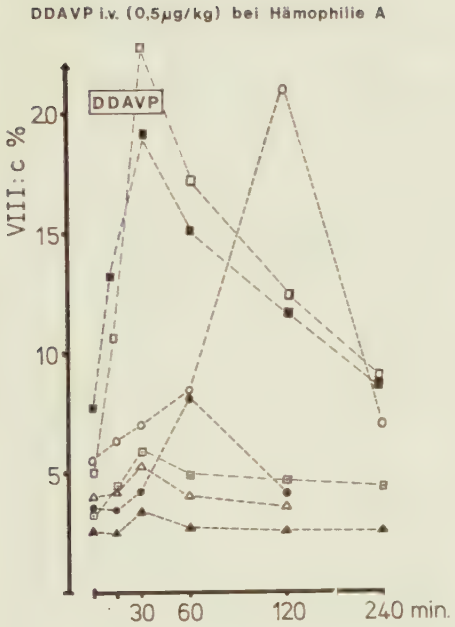

Abb. 17: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und VIII:c bei Hämophilie A

DDAVP i.v. (0,5µg/kg) bei Hämophilie A

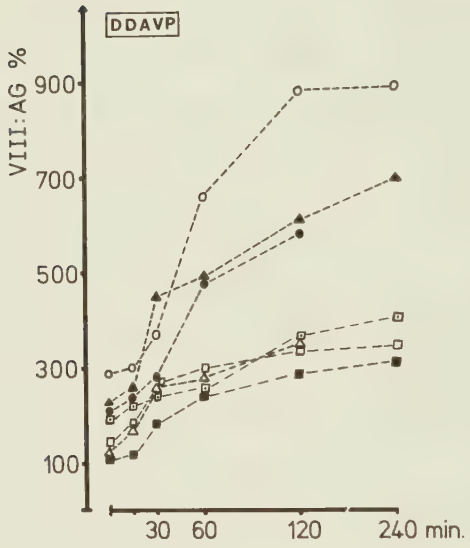

Abb. 18: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) VIII:AG bei Hämophilie A

Die durch DDAVP Gabe stimulierten Probanden mit leichter bis mittelschwerer Hämophilie A (wobei keiner der Patienten in der letzten Zeit substituiert wurde und eventuelle Restzustände zu berücksichtigen wären) zeigen einen bis zu 4-fachen Anstieg des VIII:c (Abb. 17) bei Ausgangswerten zwischen 1 und 10 %. Bei normalen bis erhöhten Ausgangswerten läßt sich das Faktor VIII assoziierte Antigen bis auf das 4 - fache steigern (Abb. 18). Die Steigerung verhält sich bei beiden Parametern etwa den Normalpersonen entsprechend, wobei die Individualität einer jeden Steigerung gewahrt bleibt. Entgegen den Beobachtungen von Mannucci ließen sich die Patienten mit Faktor VIII Werten unter 5 % ebenfalls

stimulieren, obwohl die Stimulation bei sehr niedrigen Werten nicht so eindrucksvoll war. Diese Feststellung deckt sich mit der von Seiler (126), der die Auffassung vertritt, daß eine Stimulierung selbst bei Werten unter 1 % Gerinnungsaktiviät möglich ist.

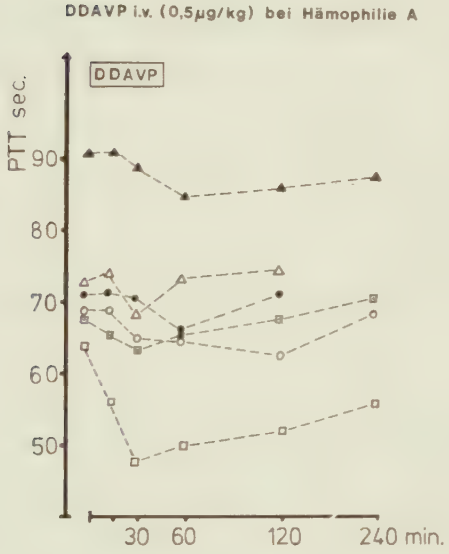

Abb. 19: DDAVP i. v. (0,5 1g/kg) und PTT bei Hämophilie A

Die partielle Thromboplastinzeit wurde bei sehr hohen Ausgangswerten regelmäßig, aber weniger ausgiebig verkürzt als bei Normalpersonen (Abb. 19). Diese Tatsache spricht dafür, daß auch bei schwerem Faktor VIII Mangelzustand das Gerinnungssystem eine globale Wirkung auf die Gabe von DDAVP zeigt, auch wenn der eigentliche Defekt nicht ausgeglichen werden

kann. Dies entspricht der von Sutor und Mitarbeitern mit Hilfe der Hämorrhagometrie gewonnen Erkenntnis, daß sich die Blutungszeit unter DDAVP-Gabe verkürzt (135).

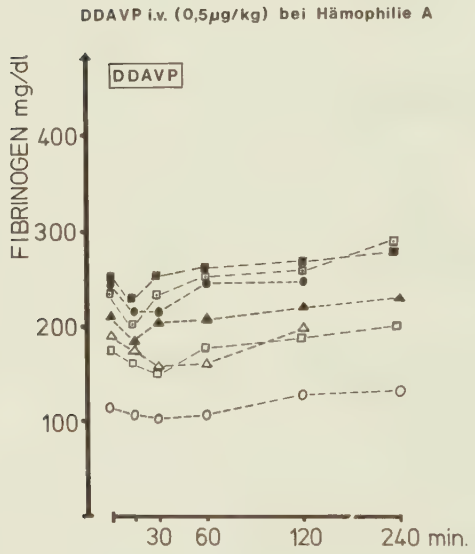

Abb. 20: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und Fibrinogen bei Hämophilie A

Das Fibrinogen (Abb. 20) weicht in keiner Weise von den zuvor bei Normalpersonen festgestellten Ergebnissen und den sich daraus ergebenden Erklärungen ab.

Es muß jedoch festgestellt werden, daß sich eine gesetzmäßige Beziehung im Sinne einer etwa kompensatorisch höheren Antigenkonzentration bei

extrem erniedrigter Gerinnungsaktivität relativ niedriger Antigenaktivät bei milderen Formen der Hämophilie A, oder aber ein gekoppeltes Verhalten beider Parameter (relativ hohe bzw. niedrige Gerinnungsaktivität - gleichzeitig hohe bzw. niedrige Antigenkonzentration) nicht ermitteln ließ. Als Erfolg der DDAVP Stimulation läßt sich für die Bluter feststellen, daß bei mittelschwerer und leichter Hämophilie A die Hämostase derartig verbessert wird, daß die Gerinnungsparameter auf subnormale Werte gebracht werden können. Blättler (17) und speziell Mannucci (89) teilen mit uns die Ansicht, daß auf Grund der Faktor VIII:c Erhöhung in dem subnormalen Bereich die hämostatischen Verhältnisse kleinere Operationen wie z.B. Zahnextraktion zulassen. DDAVP kommt dabei vor allem dem verständlichen Anliegen der Patienten mit seltener Substitutionsbedürftigkeit nach, die Risiken der Transfusion von gepoolten Blutprodukten zu ersparen.

Die Hämophilie A zeichnet bekanntlich einen niedrigen bis minimalen Faktor VIII:c Spiegel aus, welcher durch Faktor VIII angereicherte Plasma-Präparate als Therapie der Wahl angehoben werden kann. Die nicht unerheblichen Risiken wie Hepatitis und andere Nebenwirkungen der Plasma-Präparate gefährden den Bluter, sodaß die von Mannucci (89) und Prowse et al. (112) beschriebene Faktor VIII Stimulation durch DDAVP für die Hämophilen einen Lichtblick bot.

Dieser Lichtblick ist besonders gut in den Diagrammen (Abb. 17 - 20) zu erkennen. Besondere Beachtung kommt den 3 Patienten zu, die DDAVP als Prämedikation zur Zahnextraktion erhielten, da bei ihnen eine Blutstillung von extremer Wichtigkeit ist. Diese Patienten der Hämophilie A verhielten sich in allen untersuchten Gerinnungsparametern nach Praemedikation mit DDAVP 0,5 µg/kg erwartungsgemäß, wobei eine individuell

differente Stimulation des Faktor VIII:c auch hier erwartet wurde. Dabei traten bei allen 3 Patienten nach Zahnextraktion zuerst keinerlei Blutungen auf, welches für den Patienten (⊙) wegen der geringen Aktivitätszunahme bemerkenswert ist. Dagegen mußte gerade der Patient mit dem höchsten Aktivitätsanstieg (□), 4 Stunden nach der Operation wegen einer einsetzenden Blutung mit Kryopräzipitat substituiert werden. Wie sich jedoch nach Rückfrage in der Kieferklinik herausstellte, konnte man aus organisatorischen Gründen diesen Patienten erst 3 1/2 Stunden nach Infusionsbeginn operieren. Offensichtlich war die Zeit der größten Gerinnungsaktivität verstrichen. Somit spielt die Halbwertzeit bei der Operation eine bedeutende Rolle um eine optimale Blutstillung bei dem Patienten zu gewährleisten.

Weiterhin ist bei den Hämophilen zu beobachten, daß bei besonders starker Aktivitätszunahme des VIII:c eine normal langsame Aktivitätsabnahme vorhanden ist. Aus dieser ebenfalls von Blättler (17) und Schimpf (123) beobachteten Korrelation ergab sich die Berechnung der Halbwertzeit nach folgender mathematischer Beziehung: Zuwachs an AHF in Prozent (d.h. Maximum minus Vorwert) geteilt durch 4 gleich Halbwertzeit des zusätzlichen AHF in Stunden. Diese Berechnungsformel trifft nicht unbedingt bei gesunden Probanden zu (17). Es bleibt festzuhalten, daß DDAVP bei kleineren Operationen unter Berücksichtigung der gerinnungsphysiologischen Zeiten für hämophile Patienten mit geringer Substitutionsbedürftigkeit eine echte Alternative zur Substitutionstherapie darstellt.

5.3 DDAVP bei gesicherten wahrscheinlichen und möglichen Konduktorinnen.

Es ist im Rahmen einer erbbiologischen Beratung, z.B. bei erstmaligem

oder weiterem Kinderwunsch einer weiblichen Verwandten eines Patienten mit Hamophilie A, für die Betroffenen von weittragender Bedeutung, das Vorliegen eines Konduktorinnenstatus rechtzeitig auszuschließen oder zu bestätigen.

Früher nahm man an, daß bei Konduktorinnen entsprechend der Veränderung des einen x - Chromosoms eine Reduktion der Faktor VIII Synthese auf etwa 50 % der Norm vorliegen müsse. Dieser Versuch des Konduktorinnennachweises durch Bestimmung der Faktor VIII - Gerinnungsaktivität wurde jedoch aufgegeben. Die Entdeckung der Bestimmungsmethode für das Faktor VIII - assoziierte Antigen auf immunologischem Wege erbrachte eine größere Aussagekraft und Treffsicherheit. (114, 150)

Mißt man bei Konduktorinnen lediglich die Faktor VIII Gerinnungsaktivität, so zeigt sich, daß diese bei Konduktorinnen als Gruppe betrachtet, tatsächlich etwa bei 50 % der Norm liegt. (21, 114, 150).

Manche Konduktorinnen jedoch können durchaus Werte im unteren Normbereich aufweisen (47, 49, 77, 85, 91, 97, 105, 114, 139) und sind somit nur aufgrund dieses diagnostischen Kriteriums nicht von Normalpersonen zu unterscheiden. Oberdies ist der unter Streß - und solchen dürfte diese wichtige Untersuchung für die meisten Probandinnen darstellen - erfolgende Faktor VIII Anstieg hierbei als Fehlerquelle von nicht geringer Bedeutung. Das bei Konduktorinnen charakteristische Mißverhältnis zwischen Faktor VIII Gerinnungsaktivität und Antigenkonzentration macht man sich seit einiger Zeit bei der Diagnostik des Obertragerinnenstatus zunutze: Bennett, Ratnoff (12) und Zimmermann et al. (150) bestätigten durch Bestimmung des Quotienten AC/AG bei 92 bzw. 95 % gene-

tisch gesicherter Konduktorinnen die Diagnose. Neuere Untersuchungen ergaben bei gleicher Methode und gleichem statistichen Verfahren wesentlich schlechtere Ergebnisse. So beschrieb Bouma (21) eine Fehlerquote von 12,4 % und Meyer (96) 18 %. Ähnlich unbefriedigende Ergebnisse wurden von Bennett und Huehms (7) beschrieben. Diese falsch positive Differenz gilt es im Sinne einer sicheren Diagnostik zu mindern. Da die Faktor VIII Gerinnungswerte variabel sind, und die Ratio (VIII R) durch Fremdkomponenten ebenfalls belastet wird, erschien eine definierte Belastung mit max. Stimulierung des Gerinnungssystems durch die Gabe von DDAVP angezeigt. Die zuvor bereits beschriebene Untersuchungsanordnung und die sich daraus ergebenden Werte sind in den hier folgenden Diagrammen für die gesicherten und wahrscheinlichen Konduktorinnen dargestellt:

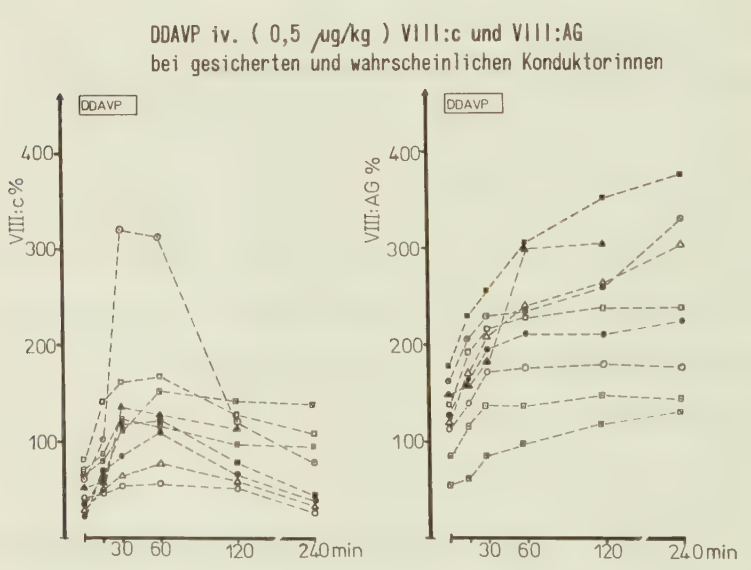

Abb. 21: DDAVP i. v. (0,5µg/kg) VIII:c und VIII:AG bei gesicherten und wahrscheinlichen Konduktorinnen

Die Faktor VIII:c Aktivität (Abb. 21) zeigt bei Ausgangswerten von 25 - 80 % und einer Stimulierbarkeit auf das durchschnittlich 2 - 3 fache des Ausgangswertes im Kurvenverlauf eine recht einheitliche Tendenz. Dabei liegen die Maxima im Mittel stark unterhalb derer von Normalpersonen. Nur eine Probandin, die vom Ausgangswert und anamnestisch gesehen nach herkömmlicher Diagnostik als wahrscheinliche Konduktorin eingestuft wurde, zeigte einen atypischen Verlauf mit einem Anstieg auf das 6 - fache. Diese Probandin liegt in der Stimulierbarkeit sogar über den Normalpersonen. Sie findet in der weiteren Diskussion besondere Beachtung.

Beim Faktor VIII assoziierten Antigen (Abb. 21), dessen Werte auf der rechten Seite dargestellt sind, wurde unter DDAVP eine bis zum zweieinhalbfachen verstärkte Aktivität nachgewiesen. Dieser Verlauf mit uniform langsamem Anstieg entspricht der Tendenz und Individualität der Kinetik bei Normalpersonen. Es fällt jedoch eine Probandin heraus, da sie bei niedrigem Ausgangswert auch eine schlechte Stimulierbarkeit zeigt. Dieses Verhalten wird noch ausführlich diskutiert.

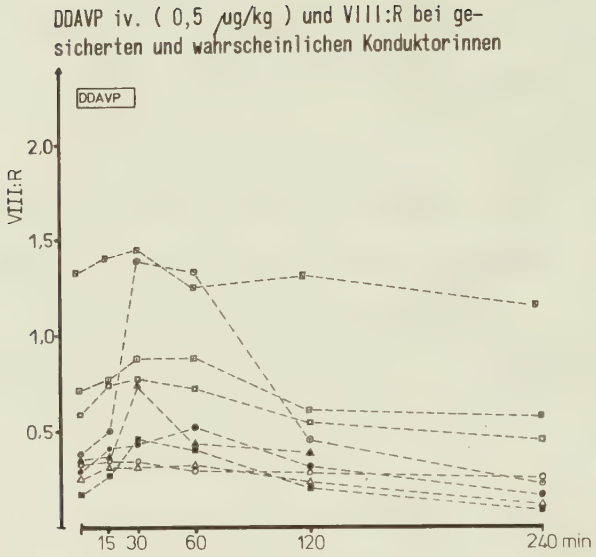

Abb. 22: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und VIII:R bei gesicherten und wahrscheinlichen Konduktorinnen.

Die Ratio (Abb. 22) als Quotient aus Faktor VIII:c und VIII:AG ist für die Diagnostik von besonderer Bedeutung, da sich hier eindeutige Werte herauskristallisieren. Die 8 Probandinnen überschreiten bei nahezu einheitlicher Tendenz den Wert 0,8 nicht (51). Nur die zuvor schon aufgefallenen Probandinnen weisen wiederum weit im Normalbereich befindliche Werte für die Ratio auf, obwohl der Ausgangswert sie als Konduktorinnen darstellte. So konnten durch die Ratio diese Probandinnen als falsch positive wahrscheinliche Konduktorinnen diagnostiziert werden.

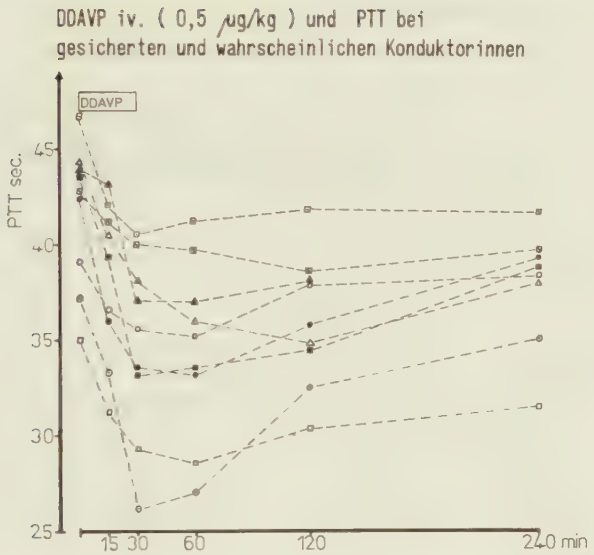

Abb. 23: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und PTT bei gesicherten und wahrscheinlichen Konduktorinnen.

Proportional zur Faktor VIII Aktivität verhielt sich die partielle Thromboplastinzeit (Abb. 23) gekennzeichnet durch die der Aktivität entsprechenden Zeitverkürzung. Es zeigt, daß DDAVP in der Lage ist, das Gerinnungssystem auch global zu aktivieren, welches durch die vorangegangenen Ausführungen belegt wird. Die extreme Stimulierbarkeit der als falsch positiv diagnostizierten Konduktorinnen zeigt sich auch hier in der starken Zeitverkürzung.

zweiten Schwangerschaft, die zu der Geburt eines gesunden Mädchens führte. Eine DDAVP Belastung wurde aus verständlichen Gründen bei dem Kind noch nicht durchgeführt.

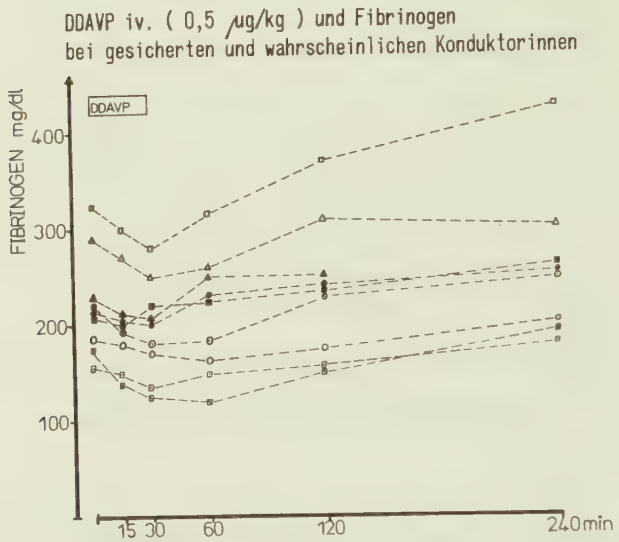

Abb. 24: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und Fibrinogen bei gesicherten und wahrscheinlichen Konduktorinnen

Die Plasmafibrinogenkonzentration (Abb. 24) zeigte bei allen Konduktorinnen den bei Normalpersonen beobachteten Verlauf als Folge von Proteolyse, Fibrinolyse oder wasserretentionsbedingte Hämodilution.

Für die 6 möglichen Konduktorinnen, bei denen nur eine positive Familienanamnese bestand, hat die Bestimmung des Konduktorinnenstatus besondere

Bedeutung. Sie befanden sich im Alter von 16 - 25 Jahren und waren kinderlos.

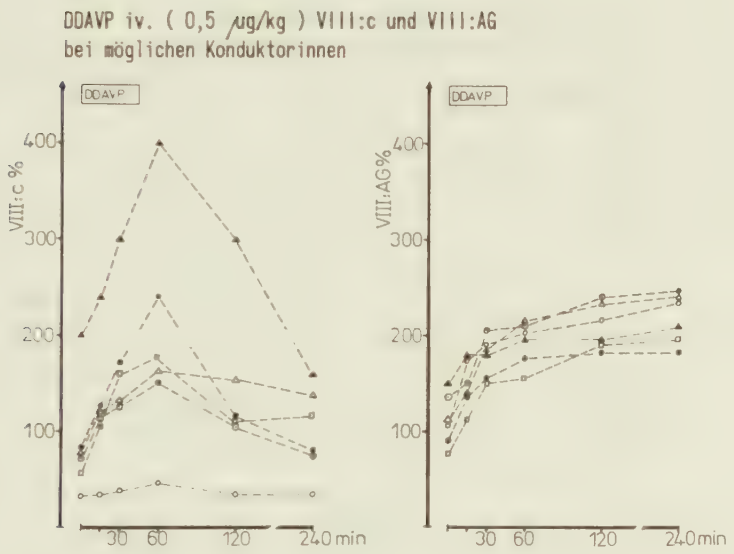

Abb. 25: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) VIII:c und VIII:AG bei möglichen Konduktorinnen.

Nur eine Probandin ▲ (Abb. 25) trat durch ihre übernormalen Anfangswerte hervor. Sie zeigte auch zusammen mit einer weiteren Probandin (▲ ●) eine extrem gute Stimulierbarkeit, welches auch bei diesen möglichen Konduktorinnen auf den zuvor schon diskutierten Prinzipien beruht. Die dritte Konduktorin □, die besonders im folgenden Diagramm fällig wird, zeigt einen mäßig guten Anstieg des VIII:c bei extrem subnormalem Ausgangswert.

Beim Faktor VIII:AG (Abb. 25 rechts) sind keine Besonderheiten im Kurvenverlauf zu erkennen.

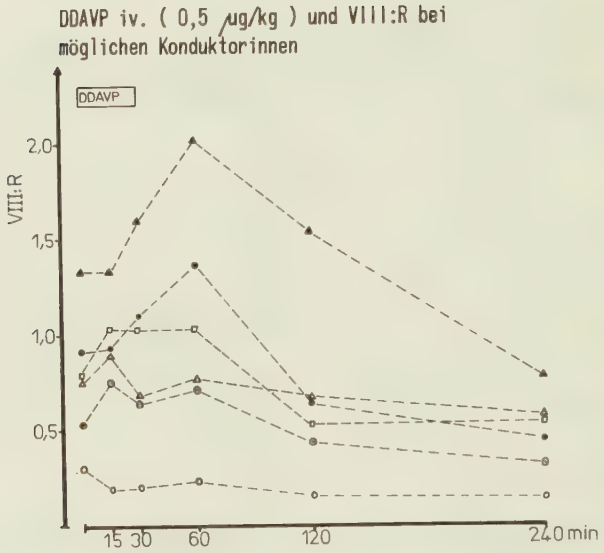

Abb. 26: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und VIII:R bei möglichen Konduktorinnen.

Erst die Faktor VIII Ratio (Abb. 26) gibt durch die Eindeutigkeit der Kurvenverläufe genaueren Aufschluß. Die drei (▲●□) möglichen Konduktorinnen schießen weit über den Wert 0,8 hinaus und sind damit als falsch positive Konduktorinnen zu diagnostizieren. Eine vierte Probandin △ , die anfangs eine Ratio im Grenzbereich aufwies, reagierte selbst unter maximaler Stimulierung mit einem raschen Wiederabfall auf den Ausgangswert. Diese geringe Stimulierbarkeit spricht für einen Konduktorinnenstatus.

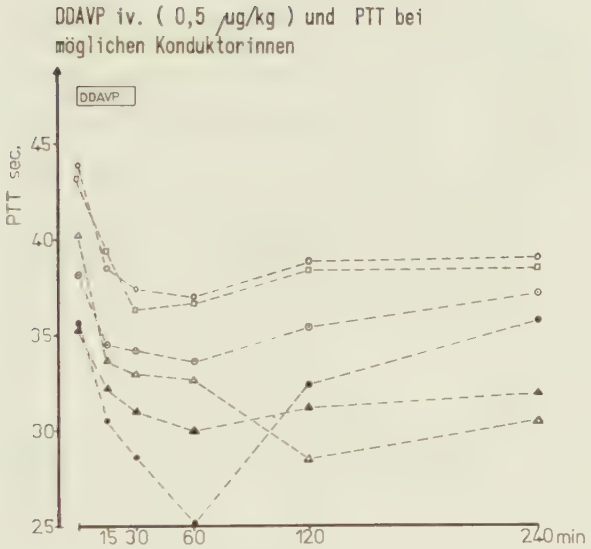

Abb. 27: DDAVP i. v. (0,5 µg/kg) und aPTT bei möglichen Konduktorinnen.

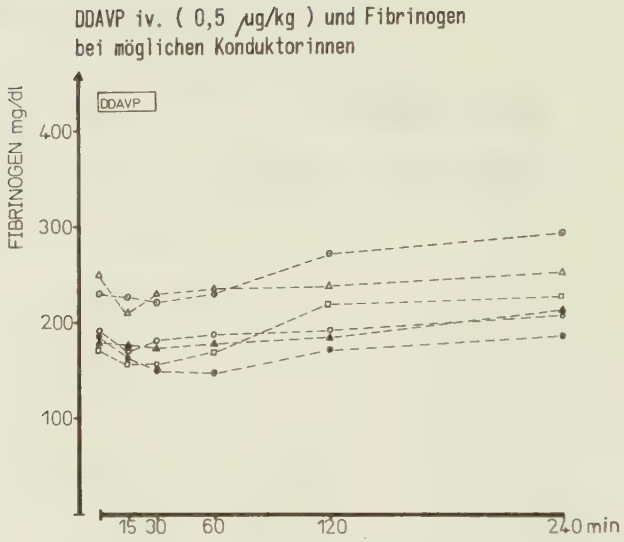

Abb. 28: DDAVP i. v. (0,5µg/kg) und Fibrinogen bei möglichen Konduktorinnen.

Die partielle Thromboplastinzeit (Abb. 27) und der Fibrinogenspiegel (Abb. 28) zeigten gegenüber den in den vorausgegangenen Untersuchungen gewonnenen und diskutierten Erkenntnissen (Proteolyse, Fibrinolyse, verstärkte Aktivität der Leber, wasserretentionsbedingte Hämodilution) keine besonderen Auffälligkeiten.

6. Zusammenfassung

Faktor VIII:c steigt bei Normalpersonen unter Gabe von DDAVP eindeutig an. Der korrespondierende Antigengehalt nimmt ebenfalls zu. Jedoch sind Anflutungs- und Abbauzeit wesentlich länger als beim Faktor VIII:c. Dies führt dazu, daß zu Untersuchungsende häufig das Maximum für VIII AG noch nicht erreicht ist. Die partielle Thromboplastinzeit korreliert, da sie ein globaler Gerinnungstest ist, sehr eng mit der Faktor VIII:c Aktivität.

Diese Beobachtungen der Pilotstudie werden durch einen Doppelblindversuch untermauert. Trotz Individualität in der Reaktion auf DDAVP ist im Doppelblindversuch die bereits angesprochene Reaktion auf die Stimulation eindeutig.

Die nasale Applikation von DDAVP bewirkt nur eine geringe Stimulation von F. VIII:c-Aktivität und F.VIII:AG-Konzentration. Hierbei spielen vor allem konzentrations- und resorptionstechnische Gründe die entscheidende Rolle. Da verschiedene Personen unterschiedlich auf eine nasale Applikation ansprechen, wird es sich für den Einzelfall empfehlen, die individuelle Ansprechbarkeit auszutesten und erst im Anschluß daran sich für eine nasale oder intravenöse Therapie zu entscheiden.

Dies ist besonders bei Patienten mit Hämophilie A von Interesse. Es läßt sich anhand des Anstiegs von VIII:c und VIII:AG sowie des korrespondierenden PTT Abfalles eine Stimulation des Gerinnungssystems durch DDAVP bei leichter bis mittelschwerer Hämophilie A aufzeigen. In einzelnen Fällen reagieren auch schwere Hämophilie A Patienten auf eine Applikation. Dies

muß jedoch für den Einzelfall geprüft werden. Eine DDAVP Gabe bedeutet für die Patienten eine wesentliche Verbesserung und Vereinfachung der Therapie. Somit besteht die Möglichkeit, die Substitution z.B. bei kleineren Traumen oder Gelenksblutungen auf ein Minimum herabzuschrauben. Ebenfalls können kleinere Operationen bei leichter und mittelschwerer Hämophilie unter DDAVP Prämedikation durchgeführt werden. Der festgestellte Faktorenanstieg bei einigen schweren Hämophilieformen ermöglicht bei nicht akuter Operationsindikation zuvor auf Stimulierbarkeit ihrer Faktoren zu untersuchen. Danach kann entschieden werden, ob DDAVP als Prämedikation zur Operation benutzt wird. Dies Verfahren hilft, die Gefahren einer Substitutionstherapie wie Erkrankung an Hepatitis, zu vermeiden.

Von besonderem Interesse ist der Belastungstest mit DDAVP zur Diagnostik des Konduktorinnenstatus für Hämophilie A. Die Konduktorinnen zeigen unter Belastung mit DDAVP einen subnormalen Anstieg des Faktor VIII:c, wobei sie von Normalpersonen gut abgrenzbar sind. Das Faktor VIII assoziierte Antigen verhält sich bei Konduktorinnen gleich dem der Normalpersonen. Zusätzlich wird beobachtet, daß bei höheren VIII:c Werten die Konduktorinnen einen hypernormalen VIII:AG-Wert aufweisen. Erst die Ratio gibt die Möglichkeit, bedingt durch den eindeutigen Kurvenverlauf, falsch positive Konduktorinnen als Normalpersonen zu identifizieren. Zu ähnlicher Schlußfolgerung kamen ebenfalls Mannucci (89) Theiss und Sauer (137) und Pollmann. Obwohl es noch weiterer Untersuchungen zur Festschreibung einer solchen Methode bedarf, stellt der DDAVP-Belastungstest einen wichtigen Schritt zur Vermeidung von Fehlklassifizierungen dar.

Eine labortechnische Identifizi-rung von Konduktorinnen ist besonders wichtig, da nach Bennett und Ratnoff (9), Pola (106) und Zimmermann (150) etwa 25 - 50 % aller Fälle von Hämophilie A auf einer Neumutation beruhen sollen.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) ABERG M., NILSSON I.M., VILHARDT H.
The release of fibrinolytic activator and factor VIII after injection of DDAVP.
4th Int. Conf. on Synthetic Fibrinolytic-Thrombolytic Agents. Carlsbad (1978).

(2) BARBUI, T. BATTISTA, R. DINI, E.
Relationship between Ristocetininduced Platelet Aggregation and Factor VIII (Activity and Antigen) in Von Willebrand's Disease.
Blut, Band XXIX, 260 - 264, (1974).

(3) BARCROFT, J.
Recent Knowledge of the Spleen.
Lancet I, 319 (1925).

(4) BARROW, E.M. GRAHAM, J.B.
Kidney Anti-hemophilic Factor. Partial Purification and some Properties.
Biochemistry 7, 3917 (1968).

(5) BARROW, E. M. GRAHAM, J. B.
Blood Coagulation Factor VIII (Antihemophilic Factor): with Comments on Von Willebrand's Disease and Christmas Disease.
Physiol. Rev. 54, 23 (1974).

(6) BENNETT, E.
Immunological Studies in Hemphilie.
Clin. Sci. 38, 118 (1970).

(7) BENNET, E. HUEHNS, E. R.
Immunological Differentiation of Three Types of Hemophilie and Identification of some Female Carriers.
Lancet I, 956 (1970).

(8) BENNETT, B. RATNOFF, O. D.
Changes in Antihemophilic Factor (AHF, Factor VIII) Procoagulant Activity and AHF-like Antigen in Normal Pregnancy and Following Exercise and Pneumoencephalography.
J.Leb.clin.Med. 80, (1972)

(9) BENNETT, B. RATNOFF. O.D.
Studies on the Response of Patiens with Classic Hemphilie to Transfusion with Concentrates of Antihemophilic Factor. A Difference in the Half-life of Antihemophilic Factor as Measured by Procoagulant and Immunological Techniques.
J. Clin. Invest. 51, 2593 (1972

(10) BENNETT, B.
RATNOFF, O.D.
LEVIN, J.
Immunological Studies in Von Willebrand's Disease. Evidence that the Antihemophilic Factor (AH) Produced after Transfusion Lacks an Antigen Associated with Normal AHF and the Inactive Material Produced by Patienta with Classic Hemophilis.
J. Clin. Invest. 51, 2597 (1972).

(11) BENNETT, B.
FORMAN, W. B.
RATNOFF, O. D.
Studies on the Nature of Antihemophilic Factor (Factor VIII).
J. Clin. Invest. 52, 2191 (1973).

(12) BENNETT, B.
RATNOFF, O.D.
Detection of the Carrier State for Classic Hemophilis.
New Engl. J. Med. 288, 342 (1973).

(13) BENTLEY, H. P. jr.
KRIVIT, W.
An Assay of Antihemophilic Globulin Activity in the Carrier Female.
J. Lab. Clin. Med. 56, 613 (1960).

(14) BIDWELL, E.
DIKE, G. W. R.
FORD. W. H.
Therapeutic Materials. General Considerations. R. Biggs "Human Blood Coagulation, Hemostasis and Thrombosis", 225 - 227, Blackwell Scientific Publication (1972).

(15) BIGGS, R.
MACFARLANE, R. G.
Human Blood Coagulation and its Disorders.
Blackwell, Oxford (1962).

(16) BLÄTTLER,W.
Klinische Anwendung von DDAVP.
1st International Symposium on DDAVP in Bleeding Disorders
March 16-17, 1979, Münster, Germany.

(17) BLÄTTLER,W.
JACKY, E.
MÖLLER, M.
GRAF, M.
MEILI, E.
Derzeitige Stellung des Vasopressinanalogons DDAVP in der Behandlung der Hämophilie A.
9. Hamburger Symposium zur Therapie der Hämophilie Nov. 78

(18) BLOOM, A. L.
GIDDINGS, J.C.
Factor VIII (Antihemophilic Factor) in Tissues, Detected by Antibodyneutralization.
Brit. J, Haemat. 23, 157 (1972).

(19) BOUHASIN, J. D.
MONTELEONE, P.
ALTAY, C.
Role of the Lymphocyte in Antihemophilic Globulin Production. A Rise of Antihemophilic Globulin Levels in a Hemophilic Subject with Acute Lymphoblastic Leukemia.
J. Lab. Clin. Med. 78, 122 (1971)

(20) BOUMA, B. N.
WIEGERINCK, Y.
SIXMA, J. J.
MOURIK, J. A. van,
MOCHTAR, J. A.
Immunochemical Characterization of Purified Antihemophilic Factor A (Factor VIII) which Corrects Abnormal Platelet Retention in Von Willebrand's Disease.
Nat. New Biol. 236, 104 (1972).

(21) BOUMA, B. N.
Immunological Studies of Antihemophilic Factor A (Factor VIII).
Neth. J. Med. 16 (1973).

(22) BOUMA, B. N.
MOURIK, J. A. van,
SIXMA, J. J.
GRAAF, S. de,
HORDIJK, J.
Von Willebrand Factor and Factor VIII.
In: IV. International Congress Thrombosis and Hemostasis, 249 (Abstr.) (1973).

(23) BOUMA, B. N.
KLAAUW, M. M. van der
VELTKAMP, J. J.
STARKENBURG, A. E.
TILBURG, N. H. van,
HERMANS, J.
Evaluation of the Detection Rate of Hemophilis Carriers.
Thromb. Res. 7, 339 (1975).

(24) BOUMA, B. N.
WIEGERINCK, Y.
SIXMA, J.J.
MOURIK, J. A. van
MOCHTAR, J. A.
Immunochemical Characterization of Purified Antihemophilic Faktor A (Factor VIII) with Corrects Abnormal Platelet Retention in Von Willebrand's Disease.
Nat. New Biol. 236, 104 (1972).

(25) BROCHGREVINK, C. F.
Acquired prolonged bleeding time in hemophilia A and B
Proc. 7th Congr. of the European Society of Haemology
London 1959 part II pp 814

(26) BROSTER, H.
Aufbereitung antihämophiler Kryopräzipitate (AHKP) aus Frischplasma und ihre Anwendung bei der Hämophilie A.
Monatsschrift f. Kinderheilkunde 116, 388 - 390 (1968).

(27) CASH, J. D.
GADER, A. M. A.
DA COSTA, J.
Release of plasminogen activator and factor VIII to lysine vasopressin, argenine vasopressin 1 desamino - 8 - d argenine vasopressin, angiotensin und oxytocin in man (Abstract)
Brit. J. Haematol. 27, 363 (1974).

(28) CASH, J. D.
GADER, A. M. A.
MULDER, J. L.
CORT, J. H.
Structure activity realations of fibrinolytic response to vasopressins in man.
Clin. Sci. Molec. Med. 54, 403 (1978)

(29) CHUANG, T. F.
SARGEANT, R. B.
HOUGIE, C.
The Intrinsic Activation of Factor X in Blood Coagulation.
Biochim. Biophys. Acts (Amst.) 273, 287 (1972).

(30) CLAUSS, A.
Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung von Fibrinogen.
Acta haemat. 17, 237 (1957)

(31) COOKE, J. V.
HOLLAND, P. V.
SHULMAN, N. R.
Cryoprecipitate Concentrates of Factor VIII for Surgery in Hemophiliacs.
Annals of Internal Medicine, 68, 39 (1968).

(32) COOPER, H. A.
GRIGGS, T. R.
WAGNER, R. H.
Factor VIII Recombination after Dissociation by $CaCl_2$.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2326 (1973).

(33) COOPER, H. A.
WAGNER, R. H.
The Defect in Hemophilic and Von Willebrand's Disease Plasmas Studied by a Recombination Technique.
J. Clin. Invest. 54, 1093 (1974).

(34) CROWELL, E. B.
CLATANOFF, D. V.
KIEKHOFER, W.
The Effect of Orel Contraceptives on Factor VIII Levels.
J. Lab. Clin. Med. 77, 551 (1971).

(35) DENSON, K. W. E.
The Detection of Factor VIII-like Antigen in Hemophilic Carriers and in Patients with Raised Levels of Biologically Active Factor VIII.
Brit. J. Haemat. 24, 451 (1973).

(36) DENSON, K. W. E.
INGRAM, G. I. C.
Antigen/Biological Activity Ratio für Factor VIII.
Lancet I, 157 (1973).

(37) DODDS, W. J.
Storage, Release and Synthesis of Coagulation Factors in Isolated Perfused Organs.
Am. J. Physiol. 217, 879 (1969).

(38) DODDS, W. J.
Hepatic Influence on Splenic Synthesis and Release of Coagulation Activities.
Science 166, 882 (1969).

(39) DODDS, W. J.
RAYMOND, S. L.
MOYNIHAN, A. C.
FENTON, J. W.
Independant Stimulators Regulating the Production of Coagulating Factors VIII and IX in Perfused Spleens.
J. Lab. Clin. Med. 79, 770 (1972).

(40) EGEBERG, O.
Blood Coagulation and Intravascular Hemolysis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 14, 217 (1962).

(41) EGEBERG, O.
Exercise and blood clotting
Scand. J. of Clin: Lab. Invest. 15, 8, (1963)

(42) EGEBERG, O.
The Effect of Exercise on the Blood Clotting System.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15, 553 (1963).

(43) EGEBERG, O.
The Blood Coagulability in Diabetic Patients.
Scand. J. Clin. Lab. Invest 15, 553 (1963).

(44) EGEBERG, O.
OWREN, P. A.
Oral Contraception and Blood Coagulability.
Brit. med. J. I, 220 (1963).

(45) EGEBERG, O.
Thyroid Function and Hemostasis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16, 511 (1964).

(46) GADER, A. M. A.
DA COSTA, J.
CASH, J. D.
A new vasopressin analogue and fibrinolysis.
Lancet, II, 1417 (1973).

(47) GARDIKAS, C.
KATSIROUMBAS, P.
KOTTAS, C.
The Antihemophilic Globulin Concentration in the Plasma of Emale Carriers of Hemophilia.
Brit. J. Haemat. 3, 377 (1957)

(48) GASTEL, C. van,
SIXMA, J. J.
BORST-EILERS, F.
LEAUTAUD, M.
MOES, M.
PLAS, P. M. van der,
BOUMA, B. N.
SYBESMA, J. Ph.
Preparation and Infusion of Cryoprecipitate from Exercised Donors.
Brit. J. Haemat. 25, 461 (1973).

(49) GITHENS, J. H.
WILCOX, P. J.
The Carrier State in Hemophilia.
Amer. J. Pediat. 60, 77 (1962).

(50) GLASSNER, K.
Das Antihämophile Kryopräzipitat (AHKP). In-vitro-Untersuchungen seiner biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften sowie in-vivo-Anwendung bei der Hämophilie A.
Dissertation, Düsseldorf (1969).

(51) GÖBEL, U.
KRIES, H. von
JÖRGENS, H.
VOSS, H. von
Problems in the detection of carriers of hemophilia A the influence of stress and thrombin.
Blut 37 , 37 (1978).

(52) GOUDEMAND, M.
FOUCAUT, M.
HABAY, D.
PARQUET-GERNEZ, A.
Les variations du taux de facteur VIII au cours de l'exercise musculaire. Essai d'interprétation.
Nouv. Rev. franc. Hëmat. 4, 315 (1964).

(53) GRALNICK, H. R.
COLLER, B. S.
MARCHESI, S. L.
Immunological Studies of Factor VIII in Hemophilia and Von Willebrand's Disease.
Nat. New Biol. 244, 281 (1973).

(54) GRALNICK, H. R.
COLLER, B. S.
MARCHESI, S. L.
Studies of the Human Factor VIII/ Von Willebrand Factor Protein Found in Normal, Von Willebrand's Disease and Hemophilia A.
Thromb. Res. 6, 93 (1975).

(55) GRIGGS, T. R.
COOPER, H. A.
WEBSTER, W. P.
WAGNER, R. H.
BRINKHOUS, K. M.
Plasma Aggregation Factor (Bovine) für Human Platelets: a Marker for Study of Antihemophilic and Von Willebrand's Factors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2814 (1973).

(56) GRUSON, R.
KERNOFF, P. B. A.
Diagnostik des von Willebrand-Jürgens-Syndroms mit Hilfe der quantitativen immunologischen Bestimmung des Faktor-VIII-assoziierten Antigens.
Dtsch. med. Wschr. 99, 1593 (1974).

(57) HARDISTY, R. M.
MACPHERSON, J. C.
A One-stage Factor VIII Assay and its Use on Venous and Capillary Blood.
Thromb. Diath. Haemorrh. 7, 215 (1962).

(58) HEMKER, H. C.
KAHN, M. P. J.
Reaction Sequence of Blood Coagulation.
Nature (London) 215, 1201 (1967).

(59) HERSHGOLD, E. J.
The Subonit Structure of Human Factor VIII (Antihemophilic Factor).
Fed. Proc. 30, 540 (1971).

(60) HIEMEYER, V.
RASCHE, H.
DIEHL, K.
Hämorrhagische Diathesen. Grundlagen, Diagnostik, Therapie.
Thieme-Verlag Stuttgart, 250 S. (1972)

(61) HOLMBERG, L.
NILSSON, I. M.
Genetic Variants of Von Willebrand's Disease.
Brit. med. J. 3, 317 (1972).

(62) HOLMBERG, L.
NILSSON, I. M.
Two Genetic Variants of Von Willebrand's Disease.
New Engl. J. Med. 288 (1973).

(63) HOLMBERG, L.
NILSSON, I. M.
Immunologic Studies in Hemophilia A.
Scand. J. Haemat. 10, 12 (1973).

(64) HOLMBERG, L.
NILSSON, I. M.
On the Structure of the Antihemophilic Factor.
In: IV. International Congress Thrombosis and Hemostasis, 249 (Abstr.) (1973).

(65) HOLMBERG , L.
NILSSON, I. M.
RASOVIC, N.
Von Willebrand's Disease with Normal Factor VIII Activity in a Homocygote.
Haemostasis 3, 237 (1974).

(66) HOWARD, M. A.
FIRKIN, B. G.
Ristocetin. A New Tool in the Investigation of Platelet Aggregation.
Thromb. Diath. Haemorrh. 26, 362 (1971).

(67) HOWARD, M. A..
SAWERS, R. J.
FIRKIN, B. G.
Ristocetin: a Mean of Differntiating Von Willebrand's Disease into two Groups.
Blood 41, 687 (1973).

(68) HOYER, L. W.
Immunologic Studies of Antihemophilic Factor (AHF, Factor VIII). IV. Radio-immunoassay of AHF-Antigen.
J. Lab. Clin. Med. 80, 822 (1972).

(69) HOYER, L.W.
Specificity of Precipitating Antibodies in Immunological Identification of Anti-hemophilic Factor.
Nat. New Biol. 245, 49 (1973).

(70) IKKALA, E.
MYLLYLA, G.
SARAJAS, H. S. S.
Haemostatic Changes Associated with Exercise.
Nature (London) 199, 459 (1963).

(71) INGRAM,G. I. C.
VAUGHAN JONES R.
KNIGHTS S. F.
DENSON, K. W. E.
HERSHGOLD, E. J.
PERKINS,J. R.
Adrenergic control of haemostasis: The effect of factor VIII.
Brit. J. Haemat. 23, 266 (1972).

(72) INGRAM, G. I. C.,
HILTON, P. J.
DDAVP in Haemophilia.
Lancet, II, 721 (1977).

(73) JOHNSON, A. J.
KARPATKIN, M. H.
NEWMAN, J.
Clinical Investigation of Intermediate and High-purity Antihemophilic Factor (Factor VIII) Concentrates.
Brit. J. Haemat. 21, 21 (1971).

(74). JUNG, E. G.
A Rapid Quantitative Assay of Factor VIII (AHF) without the Use of Hemophilic-A-Plasma.
Thromb. Diath. Haemorrh. 4, 321 (1960).

(75) KALINKE, H.
EGLI, H.
Vergleichende Untersuchungen zur Darstellung von Fibrinogen und Faktor VIII durch Alkohol-fällung (COHN) und Kryopräzipitation (POOL und ROBINSON).
Thromb. Diath. Haemorrh. 18, 389 (1967).

(76) KERNOFF, P. B. A.
RIZZA, C.R.
The Specificity of Antibodies to Factor VIII Produced in the Rabbit after Immunization with Human Cryoprecipitate.
Thromb. Diath. Haemorrh. 29, 652 (1973).

(77) KERR, C.B.
PRESTON, A. E.
BARR, A.
BIGGS, R.
Further Studies on the Inheritance of Factor VIII.
Brit. J. Haemat. 12, 212 (1966).

(78) KOBAYASHI,I.
ITO, M.
SHIBATA, A.
SHINADA, S.
TSUKADA, T.
DDAVP in haemophilia B.
Lancet, I, 615 (1978).

(79) KOKEMOHR, H.
Faktor VIII Gerinnungsaktivität und Faktor VIII assoziiertes Antigen bei Hämophilen, Konduktorinnen und Patienten mit Plättchenfunktionsstörungen.
Inangl. Diss. Med. Fak. Univ. Düsseldorf 1977.

(80) KRIES, R.v.
Faktor VIII Gerinnungsaktivität und Faktor VIII assoziiertes Antigen in der Neonatalperiode.
Inangl. Diss. Med. Fak. Univ. Düsseldorf 1977.

(81) LANGDELL, R. D.
WAGNER, R. H.
BRINKHOUSE, K. M.
Effect of Antihemphilic Factor on One-stage Clotting Test.
J. Lab. Clin. Med. 41, 637 (1953).

(82) LAURELL, C.B.
Quantitative Estimation of Proteins by Elektrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies.
Anal. Biochem. 15, 45 (1966).

(83) LECHNER, K.
Inactive Factor VIII in Hemophilia A and Willebrand's Disease.
Acta Haematol. (Basel) 48, 257 (1972).

(84) LEGAZ, M.E.
SCHMER, G.
COUNTS, R. B.
DAVIE, E.W.
Isolation and Characterization of Human Factor VIII (Antihemophilic Factor).
J. Biol. Chem. 248, 3946 (1973).

(85) LEWIS, J. H.
DIDISHEIM, P.
FERGUSON, J. H.
LI, C. C.
Genetic Considerations in Familial Hemorrhagic Disease. I. The Sex-linked Recessive Disorders, Hemophilia,and PTC Deficiency.
Amer. J. Hum. Genet. 15, 53 (1963).

(86) LOWE,G.
PETTIGREW, A.
MIDDLETON, S.
FORBES C. D.
PRENTICE C.R.M.
DDAVP in haemophilia.
Lancet, II, 614 (1977).

(87) LYON, M. F.
Chromosomal and Subchromosomal Inactivation.
Annu. Rev. Genet. 2, 31 (1968).

(88) MANNUCCI, P. M.
PARETI, F. I.
HOLMBERG L.
NILSSON, I. M.
RUGGERI Z. M.
Studies on the prolonged bleeding time in von Willebrand's disease.
J. Lab. Clin. Med., 88, 662 (1976).

(89) MANNUCCI, P. M.
RUGGERI, Z. M.
PARETI, F. I.
CAPITANIO, A.
1-deamino-8D-Arginine vasopressin: a new pharmacological approch to the management of haemophilia and von Willebrand's disease.
Lancet, I, 869 (1977a).

(90) MARCHESI, S. L.
SHULMAN, N. R.
GRALNICK, H.R.
Studies on the Purification and Charcterization of Human Factor VIII.
J. Clin. Invest. 51, 2151 (1972).

(91) MARGOLIUS, A. jr.
RATNOFF, O. D.
A Laboratory Study of the Carrier State in Classic Hemophilia.
J. Clin. Invest. 35, 1316 (1956).

(92) MCGOVERN, J. J.
STEINBERG, A. G.
Antihemophilic Factor Deficiency in the Female.
J. Lab. Clin. Med. 51, 386 (1958).

(93) MCKEE, P. A.
COUSSONS, R. T.
BUCKNER, R. G.
WILLIAMS, G.R.
HAMPTON, J. W.
Effects of the Spleen on Canine Factor VIII Levels.
J. Lab. Clin. Med. 75. 391 (1970).

(94) MEYER, D.
LAVERGNE, J. M.
LARRIEU, M. J.
JOSSO, F.
Cross-reacting Material in Congenital Factor VIII Deficiencies (Hemophilia A and Von Willebrand's Disease).
Thromb. Res. 1, 183 (1972).

(95) MEYER, D.
JENKINS, C. S. P.
DREYFUS, M. D.
FRESSINAUD, E.
LARRIEU, M. J.
Willebrand factor and Ristocetin. II. Relationship between Willebrand Factor, Willebrand Antigen and Factor VIII Activity.
Brit. J. Haemat. 28, 579 (1974).

(96) MEYER, D.
PLAS, A.
ALLAIN, J. P.
SITAR, G. M.
LARRIEU, M. J.
Problems in the Detection of Carriers of Hemophilia A.
J. Clin. Path. 28, 690 (1975).

(97) MILLER, S. P.
SIGGERUD, J.
Abnormal Blood Coagulation in Carriers of Hemophilia.
J. Lab. Clin. Med. 63, 621 (1964).

(98) NIEMITZ, J.
NOSSEL, H. L.
Activated coagulation factors in vivo and in vitro studies.
Brit. J. Haematol. 16, 337 (1969).

(99) NILEHN, J. E.
On Symptomatic Antihemophilic Globulin Deficiency.
Acta Med. Scand. 171, 491 (1962).

(100) NILSSON, I. M.
BLOMBÄCK, M.
RAMGREN, O.
FRANCKEN, J. v.
Hemophilia in Sweden. II. Carriers of Hemophilia A and B.
Acta Med. Scand. 171, 223 (1962).

(101) NILSSON, I. M.
MIKAELSSON, M.
VILHARDT, H.
WALTER, H.
DDAVP-factor VIII concentrate and its properties in vivo and in vitro.
In press (1978).

(102) NILSSON I. M.
WALTER, H.
MIKAELSSON, M.
VILHARDT, H.
Factor VIII concentrate prepared from DDAVP stimulated blood donor plasma.
Scand. J. Haematol., 22, 42 (1979).

(103) OWEN, W. G.
WAGNER, R. H.
Antihemophilic Factor: Separation of an Active Fragment Following Dissociation by Salts or Detergents.
Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 502 (1972).

(104) PASQUINI; R.
HERSHGOLD, E. J.
Effects of plasmin on human factor VIII.
Brold 41, 105 (1973).

(105) PITNEY, W. R.
ARNOLD, B. J.
Plasma Antihemophilic Factor (AHF) Concentrations in Families of Patients with Hemorrhagic States.
Brit. J. Haemat. 5, 184 (1959).

(106) POLA, V.
Klassische Hämophilie, ihre Manifestierung beim weiblichen Geschlecht.
Blut 11, 294 (1965).

(107) POOL, J. G.
Cryoprecipitated Factor VIII Concentrate.
Thromb. Diath. Haemorrh. 35, 35 (1969).

(108) PRENTICE, C. R. M.
FORBES, C. D.
SMITH, S. M.
Rise of Factor VIII after Exercise and Adrenaline Infusion Measured by Immunological and Biological Techniques.
Thromb. Res. I, 493 (1972).

(109) PRENTICE, C. R. M.
HASSANEIN, A. A.
MONICOL, G. P.
DOUGLAS, A. S.
Studies on Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Function Following Exercise in Normal and Splenectomized People.
Brit. J. Haemat. 23, 541 (1972)

(110) PRENTICE, C. R. M.
FORBES, C. D.
Hemophilia Carriers. (Letter)
Lancet 2, 403 (1974).

(111) PRESTON, A. E.
BARR, T.
The Plasma Concentration of Factor VIII in the Normal Population.
Brit. J. Haemat. 10, 238 (1964)

(112) PROWSE, C. V.
GADER, A. M. A.
CORT, J. H.
CASH, J. D.
Specifity in The factor VIII response to vasopressin infusion in man.
Br. J. Haemat. 41, 437/1979

(113) QUICK, A. J.
Mild Hemophilia. A Probability of a Variant.
Am. J. Med. Sci. 244, 535 (1962)

(114) RAPAPORT, S. J.
PATCH, M. J.
MOORE, F. J.
Antihemophilic Globulin Levels in Carriers of Hemophilia A.
J. Clin. Invest. 39, 1619 (1960)

(115) RAPAPORT, S. J.
SCHIFFMAN, S.
PATCH, M. J.
AMES, S. B.
The Importance of Activation of Antihemophilic Globulin and Proaccelerin by Traces of Thrombin in the Generation of Intrinsic Prothrombinase Activity.
Blood 21, 221 (1963).

(116) RATNOFF, O. D.
KASS, L.
LANG, P. D.
Studies on the Purification of Antihemophilic Factor (Factor VIII).
II. Separation of Partially Purified Antihemophilic Factor by Gel Filtration of Plasma.
J. Clin. Invest. 48, 957 (1969).

(117) RICK, M. E.
Klinische Chemie
Thieme-Verlag 1978.

(118) RICK, M. E.
HoYER, L. W.
Immunologic Studies of Antihemophilic Factor (AHF, Factor VIII). V. Immunologic Properties of AHF Subunits Produced by Salt Dissociation.
Blood 42, 737 (1973).

(119) RIZZA, C. R.
Effect of Exercise on the Level of Antihemophilic Globulin.
J. Physiol. (London) 156, 128 (1961).

(120) RIZZA, C. R.
EIPE, J.
Exercise, Factor VIII and the Spleen.
Brit. J. Haemat. 20, 629 (1971).

(121) SALZMAN, E. W.
Measurement of Platelet Adhesiveness.
A Simple In-vitro Technique Demonstrating an Abnormality in Von Willebrand's Disease.
J. Lab. Clin. Med. 62, 724 (1963).

(122) SCHARRER, J.
Klinische Erfahrungen und gerinnungsanalytische Untersuchungen nach Gabe von DDAVP bei Patientinnen mit von Willebrand-Syndron, milder und Subhämophilie sowie bei blutenden Konduktorinnen der Hämophilie A.
1. Intern. Symp. on DDAVP in Bleeding Disorders March 16 - 17, 1979, Münster
Schattauer Verlag Stuttgart, New York

(123) SCHIMPF, K
ROTHMANN, P.
Behandlung mit DDAVP während 18 Zahnextraktionen, 2 Muskelblutungen, 1 Bisswunde und einer Kieferhöhlenspülung bei insgesamt 8 Patienten mit milder Hämophilie A.
1. Intern. Symp. on DDAVP in Bleeding Disorders March 16 - 17, 1979, Münster
Schattauer Verlag Stuttgart, New York

(124) SCHMER, G.
KIRBY, E. P.
TELLER, D. C.
DAVIE, E. W.
The Isolation and Characterization of Bovine Factor VIII (Antihemophilic Factor).
J. Biol. Chem. 247, 2512 (1973).

(125) SCHMITZ-HUEBNER, U.
BALLEISEN, L.
POLLMANN, H.
SUTOR A.H.
DDAVP-induzierte Veränderungen der Faktor VIII-Aktivitäten bei Patienten mit von Willebrand-Jürgens-Syndrom bzw. Hämophilie A.
Blut, 38, 82 (1979).

(126) SEILER, G.
HERTLEIN, W.
Kontrolle von Osmolarität, Ionogramm und Serum-Protein-Spiegel nach i.v. und i.m. Gabe von DDAVP.
Int. Smp. on DDAVP in Bleeding Disorders. March 1979, Münster.

(127) SEILER G.
HERTLEIN, W.
NEIDHARDT, B.
SCHRICKER, K. TH.
Wirkung von DDA-Vasopressin auf die Faktor VIII-Aktivität und weitere Gerinnungsparameter bei Gesunden und bei Patienten mit Hämophilie A bzw. von Willebrand-Jürgens-Syndrom.
9. Hämophilie-Symposium Hamburg (1978).

(128) SHANBERGE, J. N.
GORE, I.
Studies on the Immunologic and Physiologic Activities of Antihemophilic Factor (AHF).
J. Clin. Pes. 18, 615 (1970)

(129) SHAPIRO, G. A.
MCKEE, P.A.
Demonstration of a Non-functional Antihemophilic Factor (Factor VIII) in Classic Hemophilie.
Clin. Res. 18, 615 (1970)

(130) SHAPIRO, G. A.
ANDERSON, J. C.
PIZZO, S. V.
MCKEE, P.A.
The Subunit Structure of Normal and Hemophilic Factor VIII.
J. Clin. Invest. 52, 2198 (1972).

(131) SHERWOOD, L.M.
HERRMANN, I.
BASSETT, C.A.
Parathyroidhormone secretion in vitro. regulation by calcium - and magnesiumions.
New Engl. J. Med. 281, 312 (1971).

(132) STITES, D. P.
HERSHGOLD, E.J.
PERLMAN, J. B.
FUDENBERG, M. H.
Factor VIII Detection by Hemagglutination Inhibition, Hemophilie and Von Willebrand's Disease.
Science 171, 196 (1971).

(133) STRAUB, P. W.
ROEDLER, G.
MEILLI, E. O.
Erhöhung des antihämophilen Globulins (Factor VIII) bei letaler Lebernecrose.
Schweiz. med. Wschr. 96, 1199 (1966).

(134) STRAUSS, H. S.
DIAMON, L. K.
Elevation of Factor VIII (Antihemophilic Factor) during Pregnancy in Normal Persons and in a Patient with Von Willebrand's Disease.
New Engl. J. Med. 269, 1251 (1963)

(135) SUTOR, A. H.
POLLMANN, H.
ARENDS, P.
Intranasal application of DDAVP in severe haemophilia.
Lancet, I, 446 (1978)

(136) SUTOR, A. H.
POLLMANN, H.
ARENDS, P.
Intranasale Behandlung der Hämophilie mit einem Vasopressinabkömmling (DDAVP).
Monatsschr. Kinderheilkd., 127, 281 (1979).

(137) THEISS, W.
SAUER, E.
DDAVP: Alternative zur Substitutionsbehandlung bei leichter Hämophilie A und von Willebrand-Jürgens-Syndrom.
Dtsch. Med. Wschr., 102, 1769 (1977)

(138) THEISS, W.
SCHMIDT, H.
DDAVP in von Willebrand's disease: Repeated administration and the behaviour of the bleeding time.
Thrombosis Res., 13, 1119 (1978).

(139) VELTKAMP, J. J.
DRION, E. F.
LOCLIGER, E. A.
Detection of the Carrier State in Hereditary Coagulation Disorders II.
Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 403 (1968).

(140) VOSS, H. von
BERGMANN, F.
GÖBEL, U.
RICHTER, O.
JÖRGENS, H.
Plättchenfaktor - 3 - Verfügbarkeit und Malonyldialdehyd-Produktion von Thrombozyten bei Kindern mit Hämophilie in H.K. Berddin (Hrgb.) Prostaglandine und Plättchenfunktion.
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York 1978, 358

(141) VOSS, H. von
GLOBISCH, T.
GÖBEL, U.
Einfluß von DDAVP auf Parameter der primären Hämostase.
Int. Sym. on DDAVP in Bleeding Disorders 16-17. March, 1979, Münster.

(142) WEBSTER, W. P.
ZUKOSKI, C. F.
HUTCHIN, P.
REDDICK, R. L.
MANDEL, S. R.
PENICK, G. P.

Plasma Factor VIII Synthesis and Control as Revealed by Canine Organ Transplantation.

Am. J. Physiol. 220, 1147 (1971).

(143) WEISS, H. J.
KOCHWA, H.

Molecular Forms of Antihemophilic Globulin in Plasma Cryoprecipitate and after Thrombin Activation.

Brit. J. Haemat. 18, 89 (1970).

(144) WEISS, H. J.
PHILLIPS, L. L.
ROSNER, W.

Separation of Subunits of Antihemophilic Factor (AHF) by Agarose Gel Chromatography.

Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 212 (1972).

(145) WEISS, H. J.
HOYER, L. W.

Von Willebrand Factor Dissociation from Antihemophilic Factor Procoagulant Activity.

Science 182, 1149 (1973).

(146) WEISS, H. J.
ROGERS, J.
BRAND, H.

Defective Ristocetin-induced Platelet Aggregation in Von Willebrand's Disease and its Correction by Factor VIII.

J. Clin. Invest. 52, 2697 (1973).

(147) ZACHARSKI, L. R.
BOWIE, E. J. W.
TITUS, J. L.
OWEN, C. A.

Synthesis of Antihemophilic Factor (Factor VIII) by Leukocytes: Preliminary Report.

Mayo Clinic Proc. 43, 617 (1968).

(148) ZACHARSKI, L. R.
BOWIE, E. J. W.
TITUS, J. L.
OWEN, C. A.

Cell Culture Synthesis of a Factor VIII-like Activity.

Mayo Clinic Proc. 44, 784 (1969).

(149) ZIMMERMANN, T. S.
RATNOFF, O. D.
LITTELL, A. S.

Detection of Carriers of Classic Hemophilia Using an Immunologic Assay for Antihemophilic Factor (Factor VIII).

J. Clin. Invest. 50, 255 (1971).

(150) ZIMMERMANN, T. S.
RATNOFF, O. D.
POWELL, A. E.

Immunologic Differentiation of Classic Hemophilia (Factor VIII Deficiency) and Von Willebrand's Disease.

J. Clin. Invest. 50, 244 (1971).

Lebenslauf

Geboren am 31.01.53 als Sohn des Landwirts Theo Untiedt und seiner Ehefrau Gertrud Untiedt geb. Büscher in Ahlen, wurde r.k. getauft.

1959 Besuch der Kath. Volksschule St. Ludgeri in Ahlen
1965 Wechsel zur Städt. Realschule Ahlen
1970 Obergang zum Städt. Gymnasium i.A. für Realschulabsolventen, das ich am 25.05.1973 mit der allgemeinen Hochschulreife verließ.

WS 73/74 Aufnahme des Studiums der Chemie an der Universität Göttingen.

WS 73/74 Wechsel zur Universität Münster zum Studium der Physik und Chemie Dipl. Gleichzeitig wurden Kurse der Vorklinischen Medizin absolviert.

SS 76 Obergang zur Universität Bochum für den Kurs der Mikroskopischen Anatomie

SS 76 Aufnahme des Studiums der Medizin zum 4. Vorklinischen Semester an der Universität Gießen.

WS 76/77 Wechsel zur Universität Düsseldorf zum Weiterstudium der Medizin.

März 77 Physikum
März 78 1. Staatsexamen
März 80 2. Staatsexamen
April 80 bis Nov. 80 praktisches Jahr an den Städt. Krankenanstalten Krefeld
Nov. 80 bis März 81 praktisches Jahr in New York
7. April 81 + 7. Mai 81 3. Staatsexamen

Für die freundliche Oberlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. U. Göbel. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. von Voss, Frau Rausch-Krämer und Frau Sievers für ihre Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.

Fotodruck Specht, Rieckstraße 26, 4720 Beckum-Neubeckum, Telefon (0 25 25) 79 80